

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LOS
LEUCOCITOS DE CONEJO BAJO
CONDICIONES DE ANEMIA INDUCIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

ALEJANDRA MAINERO DEL PASO

1 9 7 9

6392

672



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	Página
INTRODUCCION	1
Primeros Estudios sobre la sangre	1
Origen de las Células Hematopoyéticas	3
Regulación Hormonal de la Hematopoyesis	6
Modelo de la Hematopoyesis	7
Características Morfológicas de los Leucocitos	9
Objetivo	15
MATERIALES Y METODOS	18
Inducción de la Anemia	18
Procesamiento de la sangre	18
Hematocrito	18
Número de Células Blancas	19
Preparación de Frotis	19
Tinción de frotis	20
Conteo Diferencial	20
Estadística	21
RESULTADOS Y DISCUSION	22
CONCLUSIONES	38
RESUMEN	41
FIGURAS Y TABLAS	42
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUCCION

La sangre ha representado desde tiempo inmemorial un tópicico de gran interés. Así, ya desde la época de Empédocles se consideraba que la sangre constituía uno de los cuatro humores del cuerpo (Bernal, 1969). El estudio de la sangre prosiguió a través de las diferentes épocas históricas y ha sido enfocado desde los más diversos puntos de vista (morfológico, fisiológico, bioquímico, etc.), lo cual, ha aportado un conocimiento más detallado de este tejido. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos que dan origen a la diferenciación de las células sanguíneas, y a los cambios que se presentan en ellas cuando existe un factor que altere su producción, ya que los casos en los cuales puede realizarse una observación detallada se limitan a anomalías clínicas principalmente.

El propósito de este trabajo es estudiar la variación de las poblaciones de leucocitos en conejos hechos anémicos por sangrado.

PRIMEROS ESTUDIOS DE LA SANGRE

A pesar de que la sangre ha sido considerada como el asiento del "espíritu vital" desde tiempos antiguos, su estudio científico tomó un verdadero ímpetu hasta el siglo XVI (Yoshikawa, 1974). La sangre era considerada como uno de los cuatro humores del cuerpo en contraposición con los cuatro elementos de la tierra por Empédocles (siglo IV a.C.) (Bernal, 1969).

Herófilo de Calcedonia (siglo III a.C.) llevó a cabo estudios en el Museo de Alejandría proponiendo la existencia de la sangre en los vasos, venas y arterias (Sarton, 1960). De acuerdo a la fisiología Galénica, todas las funciones del cuerpo eran realizadas por varios espíritus o almas y la sangre en las arterias, con el corazón como origen del calor.

El cuadro Aristotélico del mundo, centrado esencialmente en la tierra y en el hombre, fue la base para los estudios del Renacimiento. En ellos se combinaba la Anatomía y el nuevo interés por la maquinaria, con la posibilidad de ampliar los experimentos. William Harvey (1578-1656), al buscar la explicación mecánica del movimiento de la sangre en el cuerpo, descubrió la circulación. En su obra, el corazón toma un lugar central en el cuerpo. Marcelo Malpighi (1628-1694) demostró los finos vasos capilares a través de los cuales fluye la sangre. Jan Swammerdan en 1658, describió en la sangre de rana unos corpúsculos rojizos (Bernal, 1969). En años posteriores, diversos investigadores aclararon el papel de los eritrocitos en la sangre, sin embargo, fue hasta el advenimiento de Elías Metchnikoff, con sus trabajos sobre inmunidad, cuando se descubrió el papel de los linfocitos. En esta época (finales del siglo XIX), Pablo Ehrlich introdujo los colorantes de anilina con los cuales los estudios morfológicos de la sangre y la médula ósea captaron una gran atención y se logró un adelanto notable en el estudio de la hematopoyesis (Yoshikawa, 1974).

La gran complejidad del problema -sangre y hematopoyesis ha constituido a través de la historia de la ciencia un estímulo para aplicar el talento a su resolución. Los nuevos méto

dos han transformado la concepción simplista de los primeros estudiosos del tema, y las interrogantes que actualmente se plantean han alcanzado niveles de complejidad insospechados (Bernal, 1969).

ORIGEN DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS

En los mamíferos, las células hematopoyéticas se originan en las células mesenquimatosas, es decir, en el tejido conectivo embrionario. En estos animales se forman primero las islas sanguíneas en el saco vitelino, y más tarde, en el embrión, en las áreas del tejido mesoblástico (Nelsen, 1953). De acuerdo con Maximow, 1924, estas células se diferencian en dos tipos: endotelio primitivo, y las situadas centralmente se convierten en las células sanguíneas primitivas. Estas últimas, poseen citoplasma más o menos basofílico, núcleo relativamente grande con varios nucleolos, y la cromatina esponjosa. Este tipo celular ha sido llamado: Célula Errante Primaria (Saxer), Linfocito Grande (Maximow), Hematogonia (Mollier), Hemocitoblasto (Bloom, Maximow y Jordan), Linfocidocito (Pappenheim), Hemohistioblasto (Ferrata y di Guglielmo), y, Célula Mesameboide (Minot) (Wintrobe, 1962). Estas células constituirán la base de los modelos de la hemopoyesis, ya que se requiere de células progenitoras con capacidad de proliferación continua (Siminovitch, 1963; y, Till, McCulloch y Siminovitch, 1964). En este primer periodo, de duración desconocida, no existe un órgano hematopoyético y se le denomina periodo Mesoblástico (Wintrobe, 1962).

Posteriormente, las células sanguíneas primitivas se extienden entre las células hepáticas iniciándose el periodo He

pático de la hemopoyesis, en el cual pueden encontrarse eritroblastos, megacariocitos y leucocitos granulares. Sin embargo, los linfocitos pequeños y los monocitos de la sangre adulta no se encuentran en esta etapa (Wintrobe, 1962).

La hemopoyesis en el bazo y timo es de corta duración, y aunque de predominancia linfopoyética, se encuentran sin embargo, eritroblastos y algunos mielocitos (Wintrobe, 1962). Esta abundante producción de linfocitos es característica de la primera mitad de la hemopoyesis fetal, disminuyendo progresivamente hasta el momento del nacimiento (Williams, 1972).

El periodo final o Mieloide de la hematopoyesis se inicia con el establecimiento de la circulación placentar. La médula ósea toma a su cargo no sólo la leucopoyesis, sino también la eritropoyesis, existiendo un aumento significativo en la producción de granulocitos (Williams, 1972). Así, actualmente se reconoce a la médula ósea como el órgano hematopoyético por excelencia (Wintrobe, 1962).

Existe sin embargo, una controversia en cuanto a la procedencia e interrelaciones de estas células. Algunos autores (Maximow, Dantschakoff, Weidenreich, Jordan y Bloom) mantienen que el linfocito del tejido linfático es idéntico a la célula sanguínea primitiva, y por tanto capaz de dar origen a cualquier otro tipo de célula sanguínea. Downey afirma que el linfocito es capaz de tal actividad solamente bajo condiciones anormales, y el mieloblasto es el que funciona como célula mielopotente. Este grupo ha sido denominado Escuela Monofiliética ya que propone que es un sólo tipo de célula precursora la que dará origen a todas las células sanguíneas.

En contraposición a la teoría Monofilética existe la teoría Polifilética que ha propuesto diferente número de blastos o células precursoras de las células completamente diferenciadas de la sangre, y que va desde el Dualismo de Ehrlich, Naegeli y Schridde, hasta el polifiletismo completo de la escuela de Sabin (Wintrobe, 1962).

Los estudios realizados en técnicas de colonización del bazo por células hematopoyéticas introducidas por McCulloch y Till, en los que se ha encontrado que las colonias formadas tienen capacidad de diferenciarse en granulocitos, eritrocitos y megacariocitos (McCulloch y Till, 1962; Siminovitch, McCulloch y Till, 1963; McCulloch, Siminovitch y Till, 1964; McCulloch, 1970; McCulloch y Till, 1971; McCulloch, Gregory y Till, 1973; y, McCulloch, Mak, Price y Till, 1974), y, las investigaciones de Ford con ratones irradiados que implican la existencia de un tipo de célula madre linfoide (Ford, 1968), nos conducirían a aceptar la teoría propuesta por Naegeli. En ella se propone que los precursores hematopoyéticos son el linfoblasto que dará origen a los linfocitos, el mieloblasto, (que no sólo originará la serie mieloide y granulocítica, sino también monocitos y megacariocitos), y, los pronormoblastos que darán lugar a los glóbulos rojos (Wintrobe, 1962). Sin embargo, es muy difícil asegurar dogmáticamente que este modelo sea el que corresponda a los vertebrados superiores, ya que en condiciones patológicas, y, aun en condiciones normales, ha podido observarse que existen células que sugieren estadios intermedios entre uno y otro tipo celular.

REGULACION HORMONAL DE LA HEMATOPOYESIS

Actualmente se conocen algunos factores que regulan la hematopoyesis y que deben ser capaces de dar un estímulo proliferativo, de controlar el número total de células diferenciadas que se produzcan y, si es necesario, ser capaces de mecanismos de retroalimentación inhibitoria (Metcalf, 1971).

De los factores conocidos los dos más importantes son glicoproteínas. La primera, que regula la eritropoyesis, es la eritropoyetina; ésta es una hormona que tiene su origen en el riñón e hígado y actúa a nivel de médula ósea (Till, Siminovitch y McCulloch, 1967; McCulloch y Till, 1971; Takaku y Miura, 1974; y, McCulloch, Mak, Price y Till, 1974). La segunda es conocida como CSF (Factor Estimulador de la Formación de Colonias) ó CSA (Actividad Estimuladora de Colonias) y puede considerarse como el análogo de la eritropoyetina para la serie granulocítica y monocítica. Es producida por células morfológicamente similares a los monocitos que tienen la propiedad de adherirse al vidrio (Metcalf, 1971; Price, McCulloch y Till, 1973; Messner, Till y McCulloch, 1973; Price, Senn, McCulloch y Till, 1974; y, Till, Messner, Price, Aye y McCulloch, 1974). Un tercer factor de gran importancia es la llama da Trombopoyetina que presenta ciertas similitudes químicas con la Eritropoyetina y CSF, actuando sobre los progenitores megacariocíticos para la producción de plaquetas (Metcalf, 1971).

En condiciones normales, el número de células diferenciadas en la sangre permanece relativamente constante, pero, en condiciones que requieren un aumento de la población, se ob-

servan rápidos cambios en el número celular. Estas características de la hematopoyesis implican que la producción de células diferenciadas está bajo control preciso (Till, McCulloch y Siminovitch, 1964; McCulloch y Till, 1971; McCulloch, Gregory y Till, 1973; y, McCulloch, Mak, Price y Till, 1974). Sin embargo, los sitios específicos de acción, así como los mecanismos específicos de la acción reguladora se desconocen en la actualidad.

MODELO DE LA HEMATOPOYESIS

Actualmente, muchos de los modelos de la hematopoyesis que se proponen, están basados en la existencia de células progenitoras capaces de proliferación continua. Así, se considera que el tejido hemopoyético consiste de dos compartimientos: el primero, o de las células madre, está constituido por las células progenitoras que pueden originar células diferenciadas y nuevas células madre; y el segundo o de las células diferenciadas, contiene elementos de capacidad limitada para la división celular y forma únicamente células completamente diferenciadas (Siminovitch, McCulloch y Till, 1963; Till, McCulloch y Siminovitch, 1964; y, McCulloch, Gregory y Till, 1973). De estos compartimientos, el primero contiene células que no pueden ser identificadas morfológicamente, mientras que el segundo, está formado por las células sanguíneas maduras y sus precursores morfológicamente caracterizables (Siminovitch, McCulloch y Till, 1963; Till, McCulloch y Siminovitch, 1964; y, McCulloch y Till, 1971).

Las células madre son pluripotenciales ya que pueden dar origen a células progenitoras de eritrocitos, granulocitos y

megacariocitos, y a su vez, tienen la capacidad de renovarse a sí mismas (Till, McCulloch y Siminovitch, 1964; y, McCulloch, Gregory y Till, 1973).

McCulloch propone un modelo para la hematopoyesis generalizado, ya que no sólo incluye una posible descripción para el componente mieloide, sino también para el linfoide (McCulloch, 1970). Sin embargo, es necesario recordar previamente, que en el caso del sistema linfoide no se han identificado con certeza las células madre (Wintrobe, 1962).

La dinámica propuesta por este modelo consta de tres etapas, distintas unas de otras en sus papeles en la regulación del sistema. La primera es la de células madre pluripotentes, de capacidad proliferativa extensiva, incluyendo su renovación. Los mecanismos de control más importantes son aquellos que determinan su estado proliferativo, es decir, si "descansan" o se "activan". Algunos descendientes deben "decidir" diferenciarse y cuando esto sucede, las células se encuentran en el segundo paso de diferenciación. Se les considera células diferenciadas tempranas capaces de responder a los mecanismos de control existentes en la vía que han escogido, aun cuando es notoria la disminución de su capacidad proliferativa. Bajo la influencia de estos mecanismos, las células "realizan" su decisión y sintetizan las estructuras específicas o macromoléculas que se requieren para llevar a cabo sus funciones. Estas células constituyen el tercer paso o de células diferenciadas cuya capacidad proliferativa es nula o casi nula (McCulloch, 1970).

Hasta ahora, los estudios en torno al problema de la di-

ferenciación, y el hallazgo de un modelo que corresponda a la actividad de las células hematopoyéticas in vivo ha sido afrontado en muy diversas formas, sin embargo, los mecanismos que determinan la transición de uno a otro estadio en cualquier modelo de la hematopoyesis, no han logrado comprenderse (McCulloch y Till, 1971; McCulloch, Gregory y Till, 1973; y, McCulloch, Mak, Price y Till, 1974).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS LEUCOCITOS

Las células sanguíneas maduras usualmente son divididas en tres amplias clases: células rojas o eritrocitos, células blancas o leucocitos y, plaquetas. Las células blancas a su vez, pueden subdividirse en linfocitos, granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos o segmentados) y, monocitos (Metcalf, 1971). Los leucocitos que circulan en la sangre en condiciones normales, son células maduras con un alto grado de diferenciación y con un promedio de vida relativamente corto, días o semanas (Lawrence, 1955); con excepción de los linfocitos, son células incapaces de proliferar. Sin embargo, estas características hacen necesaria la existencia de células que las generen y que son llamadas células "poyéticas" o células madre. Es una característica de estas células madre el poder circular libremente en la sangre, mientras que los precursores inmediatos, ya comprometidos en una línea de diferenciación, es decir, células morfológicamente reconocibles, se encuentran confinadas principalmente en la médula ósea (Metcalf 1971).

La producción de cada tipo celular se inicia con la divi

si3n mit3tica de las c3lulas hematopoy3ticas con la consiguien-
te reducci3n de tama1o y la especializaci3n funcional necesaria
que les permite ser reconocibles morfol3gicamente (Met-
calf, 1971).

Para su estudio se ha dividido a los precursores hemato-
poy3ticos en : Serie Mieloide que da origen a los mieloblas-
tos, pronormoblastos y megacariocitos; serie Linfoc3tica y,
serie Monoc3tica.

La serie Mieloide empieza su diferenciaci3n con el Mielo-
blasto que es una c3lula que pose3 un n3cleo relativamente
grande, de forma esf3rica o ligeramente oval y una peque1a
cantidad de citoplasma; su tama1o var3a entre 10 y 20 μ . La
cromatina se encuentra difusamente distribu3da como filamen-
tos muy finos o formando peque1os gr3nulos. Asimismo, pueden
observarse dos a cinco nucleolos en el n3cleo. El citoplasma
es basof3lico y puede presentarse en forma reticular, esponja-
sa o espumosa, y contiene adem3s, varios gr3nulos azurof3li-
cos grandes (Wintrobe, 1962).

El siguiente estadio corresponde al Promielocito que es
una c3lula de n3cleo exc3ntrico que conserva igual que el mie-
loblasto, el patr3n cromat3nico y el n3mero de nucleolos. En
el citoplasma existen gr3nulos azurof3licos ovoides o ligera-
mente irregulares m3s abundantes que en el estadio anterior
(Williams, 1972).

El Mielocito puede definirse como una c3lula grande, de
12 a 18 μ , de borde citopl3smico definido y en la que ya se
puede encontrar gr3nulos espec3ficos -neutrof3licos, eosinof3-
licos, o basof3licos. El citoplasma pierde su basofilia y apa-

rece un halo rosado en la región perinuclear (tinción de Wright) que luego se extiende a toda la célula. El núcleo aparece cubierto por las granulaciones y su forma tiende a ser oval y excéntrico en su posición; los nucleolos se reducen y al finalizar esta etapa el núcleo se encuentra ligeramente indentado (Wintrobe, 1962).

La indentación del núcleo inicia la etapa de Metamielocito o forma Juvenil que es una célula que ya ha perdido completamente su capacidad de división y cuya maduración subsecuente consiste principalmente en la elongación y segmentación del núcleo para formar el neutrófilo polimorfonuclear. De acuerdo con la hipótesis de Arneith, la lobulación del núcleo prosigue conforme la célula envejece. En el Juvenil, el citoplasma es uniforme, con gránulos neutrofilicos pequeños; los nucleolos ya no pueden observarse y la cromatina se condensa periféricamente en gránulos gruesos. Al iniciarse la lobulación se forman primero las Bandas que se caracterizan porque su núcleo presenta forma de herradura o banda. Este tipo celular puede encontrarse en la sangre constituyendo la forma más inmadura circulante en condiciones normales, aunque en muy pequeñas proporciones (Wintrobe, 1962).

El Neutrófilo Polimorfonuclear (Granulocito para Metcalf 1971) es una célula completamente madura, de 10 a 15 μ , cuyo núcleo formado por gránulos grandes de cromatina, se condensa en dos a cinco lobulaciones unidas por filamentos de cromatina. En el citoplasma predominan los gránulos específicos neutrofilicos (80 a 90%). En el caso del conejo, se los considera como pseudoeosinófilos, anfófilos o heterófilos ya que los gránulos son eosinófilicos, esféricos y uniformes aunque no

tan densamente empacados como en los verdaderos eosinófilos (Wintrobe, 1962 y, Williams, 1972).

Los Eosinófilos son células esféricas o ligeramente ova-les de 10 a 15 μ de diámetro. El núcleo consta de dos lobula-ciones, aunque en ocasiones puede encontrarse un tercer lóbu-lo pequeño en el filamento cromatínico que los une. Los gránulos citoplásmicos son de tamaño uniforme y relativamente grandes. En los conejos, estas granulaciones son muy abundantes, ovoides o ligeramente fusiformes (Wintrobe, 1962).

Los Basófilos son células de 10 a 15 μ de diámetro, que se distinguen por sus grandes gránulos metacromáticos que son tan abundantes que en ocasiones el núcleo queda oculto por e-llos, llenando por completo el citoplasma. En los tejidos, puede encontrarse células similares llamadas Células Cebadas, principalmente en el tejido conectivo (Wintrobe, 1962; y, Wil-liams, 1972).

El Linfocito se forma en el tejido linfoide, especialmen-te en los nódulos linfáticos, bazo, y tejidos subepiteliales linfoides tales como amígdalas, adenoides, placas de Peyer y apéndice, aunque la médula ósea también es un importante pro-ductor de linfocitos. No se conoce un ciclo de maduración cla-ramente definido como en el caso de la serie Mieloide, pero se ha sugerido que el lugar de origen de los linfocitos puede determinar su forma, así, se tendrían linfocitos pequeños pro-venientes de los nódulos linfáticos y, grandes con núcleo re-regularme del bazo (Wintrobe, 1972).

El Linfoblasto, como puede observarse en casos de leuce-mia linfoblástica aguda, es una célula grande, 10 a 18 μ , ca-

racterizada porque su núcleo, situado excéntricamente y de forma esférica o ligeramente indentado, presenta una estructura cromatínica más fina que la del linfocito maduro, pero, más gruesa que la del mieloblasto. La membrana nuclear es densa y existen 1 o 2 nucleolos. El citoplasma es escaso y con una zona perinuclear clara (Williams, 1972).

Los Linfocitos maduros son generalmente pequeños (7 μ) pero comunmente se encuentran formas mayores (10-20 μ). El núcleo se compone de agregados densos de cromatina y sus márgenes están claramente definidos. Usualmente es esférico o indentado, y se encuentra excéntricamente situado en el citoplasma. Este, puede formar solamente un pequeño halo alrededor del núcleo, o, por el contrario, ser muy abundante. En algunos linfocitos pueden observarse gránulos azurofílicos en el citoplasma (Wintrobe, 1962 y, Williams, 1972).

La célula Plasmática, considerada como un derivado de los linfocitos o de las células primitivas del tejido conectivo (Wintrobe, 1962), se caracteriza por ser una célula grande, esférica o elipsoidal que posee un abundante citoplasma basofílico y a menudo contiene vacuolas. El núcleo característicamente redondeado y en disposición excéntrica, muestra masas grandes de cromatina condensada dispuestas en rueda de carro (Ham, 1970).

Los Monocitos fueron llamados originalmente "células transicionales" por Ehrlich, ya que se consideraban como un estadio de transición entre el linfocito y los neutrófilos. Schilling (1912) y Sabin y asociados consideran que estas células se derivan de una célula madre específica, el Monoblasto. Es-

te, es una célula grande, 14 μ o más, y posee citoplasma baso-fílico; la cromatina es fina y a manera de filamentos y presenta uno o dos nucleolos grandes (Wintrobe, 1962).

El siguiente estadio de maduración corresponde al Promonocito cuyo núcleo es indentado, central y con un nucleolo. Su tamaño varía entre 12 y 20 μ , el citoplasma es escaso a moderado y presenta algunas granulaciones.

El Monocito maduro es una célula mayor que los otros leucocitos (12-20 μ), y posee abundantes gránulos muy finos en el citoplasma. El núcleo es grande y situado excéntricamente siendo usualmente reniforme o en forma de herradura. Una de las características más significativas de esta célula es la estructura como de madeja o encaje de la cromatina (Wintrobe, 1962). En frotis teñidos supravitalmente pueden encontrarse numerosos cuerpos rojo neutro (40-80) que varían en tamaño desde partículas muy finas a grandes vacuolas. Alrededor de un área clara (centrosfera), pueden observarse dos o más hileras concéntricas de pequeñas vacuolas rojo neutro de tamaño uniforme; esta "Roseta" es común en el conejo, aunque no específica para el monocito (Williams, 1972).

De acuerdo a la escuela de Sabin, la célula Epitelióide de la tuberculosis se deriva del monocito maduro por condensación y proliferación de la roseta de vacuolas de tal manera que se forma una gran roseta de vacuolas muy finas. El citoplasma de esta célula es abundante, el núcleo oval o indentado y, usualmente de tamaño mayor que el monocito. Otro tipo celular derivado del monocito es el Macrófago Tisular, o Clasmatocito o Histiocito, a pesar de que se admite que los mono-

citos no son la única fuente, ya que se pueden originar de células reticulares. Los clasmatocitos son células muy grandes (15-80 μ), de contorno irregular, citoplasma abundante y con cuerpos rojo neutro de tamaño y número variable que no presentan una distribución característica como en el caso de los monocitos. Contiene además, numerosas vacuolas y gránulos azurófilicos moderadamente gruesos que a menudo se agrupan alrededor del núcleo. El núcleo es alargado o indentado, con cromatina esponjosa y membrana nuclear claramente distinguible. La característica más sobresaliente de los clasmatocitos es su actividad fagocítica (Wintrobe, 1962).

En el Cuadro I se sintetizan los caracteres principales de los leucocitos según la tinción de Wright (Sandoz, 1952; y Wintrobe, 1962).

OBJETIVO

En condiciones normales, la producción de leucocitos se encuentra balanceada con su destrucción por mecanismos reguladores aun desconocidos (McCulloch, 1970), sin embargo, cuando la pérdida de células se ve incrementada por sangrado crónico se desconoce qué ocurre en este compartimiento. El sistema hematopoyético es capaz de incrementar el aporte de células fisiológicamente activas (Iscove, Till y McCulloch, 1970). Existen varios mecanismos por medios de los cuales podría lograrse este aumento; Iscove, Till y McCulloch (1970), proponen un incremento en la proliferación de células no diferenciadas, mecanismo que ha sido demostrado en ratón por medio de técnicas que detectan una clase de células denominadas Unidades Formadoras de Colonias, tanto en el bazo (CFU-S) como en cul-

tivo (CFU-C) (McCulloch y Till, 1962; Till, McCulloch y Siminovich, 1964; Worton, McCulloch y Till, 1969; Iscove, Till y McCulloch, 1970; McCulloch y Till, 1971; y, Rubin y Cowan, 1973).

En el presente trabajo se ha inducido la anemia por sangrado diario en el conejo ya que, en condiciones normales las fluctuaciones día con día en el número de leucocitos caen en los límites del error experimental. Estudios sobre la dinámica de formación de la sangre nos muestran que, en respuesta a la inducción de la anemia por sangrado, aparece una nueva población de células rojas diferente de la normal y cuya cinética de producción a lo largo de los días de sangrado parece seguir un patrón variable, ya que se presentan fluctuaciones que sugieren un carácter cíclico (Alba-Lois, Valdés, Becerril, Mainero y Martínez Medellín, 1976; y, Valdés, 1977).

Con la inducción de la anemia, los mecanismos productores de los leucocitos se ven amplificados, lo cual es el punto de partida del presente trabajo para investigar las variaciones que se presentan tanto en los caracteres morfológicos principales como en el número total de leucocitos y de las diferentes poblaciones. Estudios previos han sugerido una relación entre la inducción de la anemia y una respuesta leucocitaria característica similar a la presentada por las células rojas en cuanto a la ciclicidad de su producción (Becerril, Mainero, Valdés, Alba y Martínez Medellín, 1976). Así, las fluctuaciones en la población de leucocitos como consecuencia de su acelerada producción puede ayudarnos a entender los mecanismos generales reguladores de la leucopoyesis, así como a aclarar

si este proceso constituye un fenómeno cíclico como ha sido sugerido ya por las investigaciones en Collie gris de Patt, Lund y Maloney (1973), y, Adamson, Dale y Elin (1974).

	N U C L E O						C I T O P L A S M A			
	Tamaño	Posición	Forma	Color	Cromatina	MNuclear	Nucleolo	Cantidad	Color	Gránulos
1.-Granulocitos										
Mieloblasto	10-20 μ	Excéntrico, central u oval	Esférico	Morado pálido	Red muy fina	Muy fina	2-5	Escasa	Azul	Pocos azurofílicos
Mielocito	12-18 μ	Excéntrico	Oval	Morado	Fina a gruesa	Indistinta	Pequeños, menos	Moderada	Azul-rosa	Finos o gruesos, rojos o azul-negro
Metamielocito (Juvenil)	10-18	Central o Excéntrico	Herradura	Violeta pálido	Basi y ox. cromatina	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa	Neutrofílicos Eosinofílicos Basofílicos
Neutrófilo	10-15 μ	Central o Excéntrico	2-5 ó + lóbulos	Azul-violaceo oscuro	Muy gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa pálido	Rosa violáceo o rosa claro
Eosinófilo	10-15 μ	Central o Excéntrico	2-3 lóbulos	Azul-violaceo + claro	Gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa azulado	Numerosos rojo carmesí, uniformes
Basófilo	10-15 μ	Central	2 lóbulos	Azul-violaceo pálido	Gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa pálido	Muy gruesos u uniformes, negro-azulados
2.-Linfocitos										
Linfoblasto	10-18 μ	Central o Excéntrico	Esférico u oval	Morado pálido	Partículas punteadas poco densas	Moderadamente densa	1-2	Escasa	Azul pálido	Ninguno
Linfocito	7-18 μ	Excéntrico	Esférico dentado ligero	Violeta oscuro	Masas moderadas o grandes	Densa	Ninguno	Escaso	Azul cielo oscuro o rosa claro	Ninguno o pocos azurofílicos
3.-Monocitos										
Monoblasto	14 μ ó +	Central	Esférico u oval	Morado pálido	Fina y fibrosa	Presente	1-2	Escaso	Azul cielo o grisáceo	Ninguno o pocos
Promonocito	12-20 μ	Central	Dentado	Azul pálido	Fina	Presente	0-1	Moderada	Grisáceo o azul aceoso	Algunos violáceos
Monocito	12-20 μ	Central o Excéntrico	Esférico Dentado, Herradura u oval	Azul-violaceo pálido	Fina, reticulada o en madeja	Presente	Ninguno	Abundante	Grisáceo o azul aceoso	Abundantes, violáceos o lila pálido

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS LEUCOCITOS (TINCION DE WRIGHT). WINTROBE, 1962, Y SANDOZ, 1952.

MATERIALES Y METODOS

Inducción de la Anemia.- Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos de aproximadamente 3 Kg de peso que se sangraron diariamente por punción cardiaca (10 ml/Kg de peso) durante 19 días. Para reponer el hierro que perdían se les suplementó con hierro dextrán (LAFERON, Laboratorio Lakeside), que fue suministrado intraperitonealmente cada tercer día. La cantidad de hierro a administrar se calculó asumiendo que un gramo de Hemoglobina equivale a 3.35 mg de hierro (Wintrobe, 1962 y Valdés, 1977).

Procesamiento de la Sangre.- La sangre se colectó en matraces tratados con ácido etilendinitrilotetracético, sal disódica (1 mg/ml de sangre) como anticoagulante (Titriplex III Merck) (Wintrobe, 1962 y Valdés, 1977). Cada día se midió la cantidad de sangre extraída y se determinaron el número total de células blancas por mm^3 de sangre y el hematocrito; asimismo, se prepararon frotis para determinar el número total y el porcentaje de las diferentes poblaciones de leucocitos.

Hematocrito.- El volumen ocupado por las células empacadas después de centrifugar la sangre y expresado como porcentaje del volumen total, se conoce como hematocrito (Ht). Este se determinó diariamente en una centrífuga clínica Adams-Dynac centrifugando la sangre durante 10 minutos en tubos de Wintrobe (Wintrobe, 1962). Ya que la velocidad alcanzada por la centrífuga no debe ser muy elevada para evitar que se destruyan las células, la cantidad de plasma que queda entre las célu-

las empacadas varía hasta un 4%, y el coeficiente de variación en el volúmen de células empacadas es de 1-2% (Wintrobe, 1962 y Williams, 1972).

Número de Células Blancas.- Para la determinación de este parámetro se hizo, diariamente y por duplicado, una dilución 1:10 de la sangre colectada en una solución al 2% de ácido acético glacial (Baker), a la cual se le agregaron unos cristales de azul de metileno (Merck) para facilitar la diferenciación de las células en el microscopio (Siminovitch, McCulloch y Till, 1963; y, Valdés López, Comunicación Personal). Las diluciones se hicieron tomando un mililitro de sangre con una pipeta serológica y aforando con la solución. Las células se contaron en un hemocitómetro Spencer Bright-Line.

Preparación de Frotis.- Se realizó en cubreobjetos ya que Wintrobe (1962) y Williams (1972), recomiendan esta técnica para evitar que los leucocitos granulares y una gran proporción de los monocitos se destruyan o queden en los bordes de la preparación en donde son descartados por el observador. Se hicieron diez frotis por conejo diariamente con la siguiente técnica: manteniendo un cubreobjetos en la mano izquierda de tal forma que sólo los bordes queden en contacto con los dedos, se deposita en él una gota de sangre de aproximadamente 2-3 mm de diámetro. Otro cubreobjetos, sujeto con la mano derecha por sus bordes, se coloca sobre el primero de tal manera que queden cruzados y con las esquinas libres; la sangre así se distribuirá rápidamente entre los dos cubreobjetos. Antes de que se complete la distribución de la sangre se separan los dos cubreobjetos con un movimiento de deslizamiento, manteniendo una esquina de cada cubreobjetos en cada mano y

separándolas con un movimiento horizontal (Wintrobe, 1962 y, Williams, 1972). Una vez que se han separado los cubreobjetos los frotis se dejan secar a temperatura ambiente.

Tinción de los Frotis.- Una vez secos los frotis se tienen usando colorante de Wright (Merck) que se prepara empleando 0.24 g de colorante disueltos en 100 ml de Metanol (Merck). La solución se deja reposar durante cinco días y luego se filtra. El frotis se cubre completamente con el colorante que se deja durante 1.5 minutos; este procedimiento sirve para fijar el frotis al mismo tiempo que lo tinte. Al cabo de este tiempo se diluye el colorante con agua destilada, que se agrega sin tirar el colorante y aproximadamente en cantidades iguales a las de colorante empleado. Aparece en el frotis un brillo metálico de color verdoso, mientras que las márgenes muestran un tinte rojizo. Transcurridos 3.0 minutos, el colorante se lava con abundante agua corriente hasta que el frotis aparece rosado amarillento. Se dejan secar, y se montan de tres en tres en una gota de aceite de inmersión (Merck) sobre un portaobjetos.

Conteo Diferencial.- Los frotis ya montados fueron observados en un microscopio Spencer (American Optical Corporation) usando siempre el objetivo de inmersión (100 x). Una primera apreciación sirvió para determinar las principales características morfológicas de las diferentes poblaciones de leucocitos, y, posteriormente con un contador diferencial Clay Adams se hizo el conteo diferencial. El número de células por frotis que se contó fue de 200, para totalizar 2,000 células por conejo diariamente.

Estadística.- Si bien el número de células que se contaron por frotis diariamente es grande, y el periodo de tiempo que comprenden las determinaciones de hematocrito y número de células es extenso (19 días), la cantidad de conejos en los que se pudo realizar la inducción de la anemia es muy pobre por la cantidad de trabajo involucrada. Así, a los valores experimentales que se obtuvieron únicamente se les sometió a pruebas estadísticas muy sencillas y que consistieron en la determinación del porcentaje de error para los porcentajes de las diferentes poblaciones de leucocitos, y la Desviación Estándar para el número total de células blancas por mm³ de sangre ($S = \sqrt{\frac{\bar{X} - X}{n - 1}}$)

RESULTADOS Y DISCUSION

Se presentan aquí los resultados de los experimentos en donde se indujo la anemia por remoción diaria de un volumen constante de sangre a conejos Nueva Zelanda blancos. Con la sangre obtenida se determinaron hematocrito, número de leucocitos por mm^3 de sangre, así como porcentaje y células por mm^3 de sangre de los diferentes tipos de células blancas.

Puesto que el tema del trabajo requería una mayor destreza para la identificación de las células blancas así como en la preparación de los frotis, previo al inicio de los experimentos se contó con una etapa de aprendizaje en el Pabellón de Hematología del Hospital General de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. El entrenamiento bajo la tutela del Dr. Juan Martínez, tuvo una duración de dos meses y consistió de dos etapas: primero, la elaboración de frotis en cubreobjetos así como su tinción con el colorante de Wright, seguido por una fase de observación de frotis al microscopio. En las preparaciones observadas, sangre periférica y médula ósea, se contaron números elevados de células por día, para lograr la identificación correcta de los diferentes tipos de leucocitos y sus precursores en condiciones normales y patológicas.

Con la terminación de esta faceta se iniciaron los experimentos propiamente dichos con los conejos. Como ya se indicó en Materiales y Métodos, los frotis se elaboraron en cubreobjetos con lo que se obtiene una distribución pareja y muy rápida de la sangre evitando que los leucocitos granulares -principalmente basófilos- y los monocitos queden en las ori-

llas o tan maltratados que sean descartados (Wintrobe, 1962, y Williams, 1972). Asimismo, se hicieron comparaciones entre los conteos diferenciales de un conejo en un día con frotis hechos en portaobjetos y cubreobjetos. Con ello se detectó que la fórmula diferencial del frotis en portaobjetos presenta una elevación en el número de linfocitos y la disminución marcada en el número de basófilos, eosinófilos y monocitos. Otra ventaja que se obtiene con los frotis elaborados en cubreobjetos es la cantidad elevada de leucocitos que pueden contarse por preparación.

El número de células a contar fue determinado en base a experimentos anteriores (Becerril, Mainero, Valdés, Alba y Martínez Medellín, 1976) en los que se estableció que, para obtener un conteo diferencial, son suficientes 2,000 células por conejo por día.

En la identificación de los diferentes tipos de leucocitos influyen varios factores: la precipitación del colorante que una vez detectada pudo corregirse para los días siguientes, pero que afectó los frotis que ya se habían teñido; la presencia de formas inmaduras cuando el proceso anémico ya se ha establecido y que como Wintrobe (1962), Ham (1970) y Williams (1972) mencionan, son difíciles de diagnosticar con certeza en base a una tinción únicamente; las modificaciones de los diversos tipos celulares que las aleja de las características comunes y dificulta su correcta identificación; y, el número tan pequeño de algunas poblaciones. Así, en la identificación de las células blancas interviene en gran escala el factor de interpretación personal que modificará en mayor o menor grado los valores reales de la fórmula hemática del co-

nejo para cada día. Todos los tipos celulares que fueron identificados en los frotis se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

Asimismo, los resultados se presentan solamente para dos conejos lo que entorpece el empleo de métodos estadísticos sofisticados, ya que las dificultades que se presentaron -muerte de algunos conejos- aunadas a la cantidad de trabajo requerida para cada conejo por día -sangrado, conteo de células totales, preparación, tinción y conteo de los frotis- complica el manejo de más de dos conejos por experimento.

En cuanto a los animales de trabajo, los conejos fueron seleccionados cuidando hacer una evaluación hematológica previa al inicio del trabajo experimental, para emplear sólo aquellos que estuvieran dentro de los límites normales. Sin embargo, el estado real de salud del conejo es desconocido, ya que, aunque aparentemente no había síntomas de ninguna enfermedad, el catarro nasal de los conejos, que en su estadio subclínico o de portador no presenta síntoma alguno, ocasiona una reacción leucocítica -leucopenia o leucocitosis (Cheng, 1930). Asimismo, la presencia de ácaros en las orejas de los conejos que fue tratada en cuanto se detectó, pudo en alguna forma afectar la fórmula hemática.

Cheng (1930) demostró que si se mantiene al conejo en un estado de "digestión continua" por la presencia de alimentos en todo momento para que sean consumidos cuando el animal lo requiera, no se presenta leucocitosis ni leucopenia digestivas. También observó, que existe un ritmo diario muy definido en los niveles de leucocitos en la sangre en el que se presentan dos elevaciones muy marcadas, una tarde en la mañana (10-

12 a.m.) y la otra, a media tarde (3-4 p.m.). Casey (1942), afirma que en conejos normales no existe evidencia de una variación en el número total de células blancas entre 9 a.m. y 5 p.m. Sin embargo, para evitar cualquier fluctuación, se sangró a los conejos a una misma hora (10-11 a.m.). Casey, Rosahn Hu y Pearce (1936) y Pintor y Grassini (1957) han reportado variaciones estacionales en la fórmula hemática del conejo, factor que queda eliminado por la realización de los experi-mentos en la misma época del año, otoño. El sexo en los cone-jos sangrados fue en todos los casos el mismo (masculino), por lo que este factor queda descartado como elemento de varia-ción de la fórmula hemática (Cheng, 1930; y, Rosahn, Pearce y Hu, 1934). Sin embargo, existe para cada raza y para cada co-nejo un tipo característico de conteo que se mantiene a lo largo de la vida del animal y que es imposible controlar (Cheng 1930; y, Casey, Rosahn, Hu y Pearce, 1936).

Los resultados que a continuación se presentan tomando como día cero el primer día de sangrado, aunque revelan algu-nas diferencias entre ambos conejos, muestran que el comporta-miento general de los animales observados es similar y concuer-da con los datos parciales obtenidos con otros conejos que en-fermaron y/o murieron en experimentos anteriores. Esta simili-tud, especialmente notoria para el hematocrito y el número to-tal de células blancas, arroja una luz sobre el comportamien-to de los leucocitos en un proceso -anemia- que estimula gran-demente la producción de células rojas.

La Figura 4 muestra la variación del hematocrito en am-bos conejos a lo largo del periodo de sangrado. El valor ini-cial para C1 fue de 40.10 % y para c2 de 47.68 %. Puede obser

vase la tendencia a disminuir, alcanzando los valores más bajos al cuarto día: 22.38 % y 29.70 % para C1 y C2 respectivamente. A partir de este punto se encuentra un periodo en que los valores tienden a regresar a los normales (39.8 ± 4.3 %, Wintrobe, 1962). Así, para C1 es de 37.68 % al catorceavo día y para C2, 32.85 % en el quinceavo día, tomando como día cero el primer día de sangrado. Aparentemente, la recuperación es más continua para C1 (Tabla 1).

Al establecerse el proceso anémico ocurren cambios en los eritrocitos que han sido estudiados por Alba, Valdés, Becerril, Mainero y Martínez Medellín (1976) y por Valdés López (1977). La variación en el hematocrito queda expuesta claramente en la Figura 5 en la que se han promediado los valores obtenidos para ambos conejos, y en la cual puede observarse que existen dos fases en la respuesta de las células rojas que en cierta forma se cuantifican al medir el hematocrito. Primero, la etapa que va del día cero al cuarto día, en la que decrece día con día el número de eritrocitos y que puede considerarse como la etapa aguda de la anemia. La segunda, a partir del quinto día, marca el periodo de recuperación hasta alcanzar un nuevo equilibrio en el onceavo día. Este proceso está condicionado por las características propias de los eritrocitos, ya que, como no existe una reserva de estas células, en la primera etapa su número decrece diariamente hasta que se establece un mecanismo de producción masiva de glóbulos rojos (Williams, 1972), lo cual marca la segunda fase hasta alcanzar un nuevo equilibrio; en él, la producción de células rojas iguala a la pérdida por sangrado más las que naturalmente se destruyen en el organismo (Valdés, 1977). Esta fase de

equilibrio queda ilustrada en la Figura 6 tomada de Valdés López (1977), en ella, puede observarse que el equilibrio en la producción de eritrocitos se alcanza desde el octavo día, pero si se toma en cuenta que al establecerse la anemia existe una modificación del volúmen celular eritrocítico hasta de 1.6 veces, y que este cambio se estabiliza hasta el onceavo día (Valdés, 1977), el hematocrito puede considerarse como un arma valiosa en la detección de la respuesta del conejo al proceso de sangrado y al mismo tiempo, reflejará en gran medida los cambios ocasionados en la producción de eritrocitos.

Al sangrar a los conejos no sólo se están removiendo eritrocitos, sino también leucocitos aunque en menor cantidad dadas las características propias de estas células. El comportamiento de las células blancas sigue un proceso más o menos paralelo en ambos conejos (Figuras 7 y 7') y al hacer una gráfica promedio de los valores obtenidos (Figura 8), puede observarse que, al igual que el hematocrito, presenta dos fases que se encuentran relacionadas. La primera etapa está marcada por un incremento que alcanza su máximo al tercer día para luego decrecer a un valor mínimo al quinto día que a su vez, inicia lo que se considera como la fase de recuperación. En este periodo existe un incremento que alcanza su máximo al sexto día y que es muy grande para C1: $10,817.5 \text{ células/mm}^3$, y más pequeño para C2: $6,675 \text{ células/mm}^3$ de sangre, seguido de una etapa en que los valores decrecen día con día. Para C2 puede estimarse que se llega a un equilibrio al catorceavo día ya que las fluctuaciones en los valores para los días siguientes son limitadas. Al alcanzarse el equilibrio, el número de células que se extraen cada día refleja aproximadamente el nú

mero de leucocitos que se están produciendo. Para C2 puede calcularse este valor que es de 102.6×10^5 células.

Sin embargo, en C1 no se alcanza el punto de equilibrio y los valores siguen decreciendo en forma marcada hasta finalizar el experimento. Observaciones anteriores para otros conejos han mostrado un comportamiento similar al presentado por C1, en el que existe un aumento muy pronunciado en el número de células hasta alcanzar su máximo al sexto día, seguido de una disminución continua y muy marcada hasta que al noveno día mueren.

Si comparamos la gráfica promedio del número de células blancas (Figura 8) con la de Hematocrito (Figura 5), se encuentra que en ambos casos existe una fase de anemia aguda seguida por la recuperación y el equilibrio, pero que sin embargo no coinciden en el tiempo en que dichas etapas se presentan. Así, los eritrocitos alcanzan su equilibrio al octavo día y permanecen constantes a partir de este punto (Valdés, 1977). Los leucocitos alcanzan dicho equilibrio a partir del catorceavo día. Esta diferencia puede deberse primordialmente a que existe una reserva de células blancas maduras para los diferentes tipos de leucocitos; así, tenemos que para los granulocitos (segmentados, eosinófilos y basófilos) y para los monocitos existe una reserva marginal tanto en médula ósea como en los lechos capilares, el bazo y otros tejidos (Williams, 1972). Para los linfocitos la reserva es mayor ya que no sólo se encuentran en médula ósea, sino también en los nódulos linfáticos, timo, ducto torácico y bazo. Por consiguiente, aunque una vez que los granulocitos y monocitos han entrado a los tejidos, su liberación se efectúa en pequeñas cantidades, en

la primera fase de la anemia no se observa un decremento comparable al de los eritrocitos sino una elevación en su número, porque las reservas empiezan a salir a circulación evitando que se produzca la leucopenia marcada y tratando de reestablecer el número normal de leucocitos. Al llegar al quinto día, la reserva ha sido depletada lo suficiente como para producir una caída en el número de células circulantes. En este tiempo, muy probablemente el estímulo producido por el sangrado ha sido capaz de disparar uno o varios mecanismos en la médula ósea para la producción masiva de leucocitos con el tiempo necesario para la maduración de células fisiológicamente activas, y es por ello que puede postularse que el incremento que se presenta al sexto día se debe, ya no sólo a la movilización de las reservas, sino también a la liberación de nuevas células.

La presencia de formas inmaduras en mayor cantidad en la fase de recuperación apoyaría, en cierta manera, esta idea, ya que puede considerarse que el fenómeno de sangrado diario provocó, no sólo el aumento en la producción de células sanguíneas, sino también, la liberación prematura de formas celulares que no han alcanzado a completar su ciclo de maduración aunque no formen parte normalmente de la sangre circulante, en un esfuerzo por restituir el número normal de leucocitos.

Ya que se conoce el número total de células blancas (Tabla 2), y el porcentaje de cada una de las poblaciones de leucocitos (Tablas 3 y 3'), puede obtenerse el número de células por mm^3 de sangre para los diferentes tipos celulares (Tablas 4 y 4'). Al graficar estos valores relacionándolos con el número de células blancas totales (Figuras 9 y 9'), puede observarse que existe una similitud en el comportamiento de segmen

tados, monocitos y eosinófilos por lo que se les reunió en una clase única SME, formando una población que se distingue de la de linfocitos por un lado y la de basófilos por otro. Si se relacionan estas tres poblaciones para cada uno de los conejos (Figuras 10 y 10') se observa que en la primera fase de la anemia el aumento en el número total de células se debe casi exclusivamente al incremento de linfocitos, situación más evidente en el caso de C1, mientras que para la segunda fase existe un incremento mayor en el número de SME además del aumento de linfocitos.

Al realizar una gráfica promedio (Figura 11) de los valores obtenidos para las poblaciones SME, linfocítica y basofílica (Tabla 5), puede observarse que al igual que para el hematocrito y las células blancas totales, existen dos fases muy definidas. La primera fase o etapa aguda de la anemia va del inicio del experimento al quinto día en el que se observa el decremento más pronunciado de todas las poblaciones. En este periodo el incremento en el número total de células está dado por el aumento de linfocitos que es muy pronunciado. La segunda fase o de recuperación se inicia al sexto día en el que existe el máximo incremento de las poblaciones SME y linfocítica. En esta etapa los principales aumentos en la población total van ligados, primordialmente, al incremento de la población SME y, parece que los linfocitos se encuentran desfasados en cierta forma, respecto a SME exceptuando el pico que forman al onceavo día. La curva para los basófilos parece comportarse en forma errática y desfasada respecto a las otras dos poblaciones. Así, el máximo decremento de la primera etapa se localiza al cuarto día iniciándose una fase de recupera

ción que llega a su máximo al séptimo día. A partir de este punto se comporta en forma más o menos sincronizada con la población SME. Esto resulta desconcertante ya que de acuerdo a la Teoría Dualista propuesta por Naegeli y considerada como uno de los modelos más aceptados, los basófilos se derivan de la serie Mieloide que también origina la población SME. Por ello, se esperaría que las variaciones presentadas siguieran un mismo patrón en la poblaciones involucradas, y, al comportarse los basófilos como una población independiente surge la pregunta, ¿se derivan o no de la serie mieloide?

El aumento de linfocitos totales en la primera fase está dado principalmente por el incremento de la población de linfocitos pequeños casi carentes de citoplasma que se presenta a partir del segundo día. Esto puede explicarse por la gran reserva que existe para esta población y porque puede suponerse que parte de los linfocitos encontrados son en realidad células madre linfoides (Ford, 1963) que buscan su sitio de establecimiento para la formación de nuevas colonias de células sanguíneas. Sin embargo, no puede decirse que la totalidad de estos linfocitos pequeños o células progenitoras "con las ambiguas características de linfocitos pequeños" (Williams, 1972) sean capaces de presentar los cambios necesarios que las conviertan en células precursoras. Maximow postuló que los linfocitos pequeños son capaces de hipertrofiarse convirtiéndose nuevamente en células grandes capaces de futuras divisiones (Williams, 1972) y puede considerarse entonces a los linfocitos pequeños como células en reposo y no como células terminales (Wintrobe, 1962).

Acerca de las células inmaduras puede decirse muy poco.

Los blastos, mielocitos, juveniles y bandas que pueden observarse en los frotis, no forman parte normalmente de la sangre periférica, a excepción de las bandas que forman un pequeño número de las células totales. Además de que estas células forman una parte muy pequeña de la fórmula hemática, no todas se encuentran desde el inicio del experimento en ambos conejos, C1 presenta mielocitos y normoblastos y, C2, mielocitos, juveniles y bandas.

El número de células inmaduras aumenta grandemente en lo que se considera como fase de recuperación. En ambos conejos, las poblaciones más abundantes son las de bandas y normoblastos (Figura 12); ésto podría explicarse si consideramos que las bandas son el estadio anterior al segmentado maduro y que aun sin patología alguna se les puede encontrar en circulación, lo que significaría que existe una mayor facilidad de liberación de la médula para este tipo celular. Los normoblastos o precursosres de las células rojas sufren con el establecimiento de la anemia un gran estímulo ya que se remueven muchas más células rojas que blancas con el sangrado. Este factor provoca un aumento en la producción que ha sido demostrado mediante la cuantificación de reticulocitos en la sangre (Valdés, 1977) y tratándose de células más pequeñas que los blastos de las células blancas, no resulta tan extraña la presencia de normoblastos en la circulación en cantidades relativamente elevadas.

Los mielocitos y juveniles alcanzan valores más reducidos que los de las poblaciones anteriores, sin embargo, su incremento respecto al punto inicial hace pensar que el proceso al que se ha sometido a los conejos es lo suficientemente enérgico

gico como para desencadenar la liberación de estas células en un intento por reconstituir la fórmula hemática normal.

La aparición de los blastos es aun más rara y reducida que la de las otras poblaciones de células inmaduras, y tanto en números totales como en porcentajes constituyen la población más pequeña. La identificación de cada tipo de blasto no puede hacerse con certeza basándose únicamente en la tinción (Wintrobe, 1962; y Williams, 1972), sin embargo, la observación minuciosa al microscopio mostró la presencia de cuatro nucleolos en la mayoría de las células blásticas con su consiguiente inclusión en la categoría de los mieloblastos (Sandoz, 1952 y Wintrobe, 1962). Los otros blastos aparentemente corresponden a los linfoblastos.

No existe coincidencia en cuanto al día en que se presentan los máximos incrementos de las células inmaduras en ambos conejos; ésto puede deberse al estado real de salud ya que existe la posibilidad de una infección en estadio subclínico con ausencia de síntomas (Cheng, 1930) y, a las diferencias individuales en la respuesta del conejo al proceso anémico.

Patt, Lund y Maloney (1973) y, Adamson, Dale y Elin, (1974) observaron en el Collie gris cierta periodicidad en la producción de las células sanguíneas que incluía las poblaciones de neutrófilos, reticulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas, con ciclos muy determinados. Sin embargo, en los conejos observados no pudo detectarse indicio alguno de ciclicidad en las variaciones presentadas por las poblaciones de células blancas.

Los valores reportados para el conteo diferencial de co-

nejo y los obtenidos en los animales experimentales se muestran en la tabla siguiente:

	Céls. Totales (mm ³)	Segmen- tados %	Eosinó- filos %	Basófi- los %	Linfo- citos%	Monocitos %
Wintrobe (1962)	7.7-7.9x10 ³	43.4 - 49.4	1.5 - 2.0	4.3 - 6.7	32.9 - 41.8	9 - 9.5
Pintor y Grassini (1957)	7,073±1882	37.8 ± 13.18			53.26 ± 14.0	
Casey Rosahn Hu y Pearce (1936)	9,890	43.4	1.2	6.4	37.5	11.5
C1	6,368	40.83	0.697	1.79	45.91	10.35
C2	6,195	44.30	1.4	1.80	44.90	7.0

Con excepción de los basófilos, los valores obtenidos que dan dentro de los límites reportados; en experimentos anteriores el valor más elevado que se encontró para esta población fue de 2.5 % cuando se obtiene la fórmula hemática de conejos que no han sido sangrados. Sin embargo, el rango de variación que se reporta para los basófilos es muy elevado para una población tan pequeña, lo cual hace suponer que se trata de un tipo celular con amplias fluctuaciones y que se mantiene constante para los animales empleados en los diferentes trabajos. Por ello, no se considera que los basófilos representen un estado patológico en los niveles bajos que se han obtenido.

Las observaciones cualitativas de los resultados obtenidos para los frotis se basan en la apreciación personal de los cambios morfológicos más notorios presentados por las distintas poblaciones de leucocitos a lo largo del experimento. Las principales variaciones detectadas fueron en tamaño, características de granulación en los segmentados y variaciones en

la tinción de los monocitos.

Una característica que cambió en todas las poblaciones fue el tamaño que disminuyó notablemente, cambio que se vió acentuado por la presencia de eritrocitos de mayor tamaño a partir del noveno día.

Los linfocitos presentaron básicamente diferencias en cuanto al tamaño. Así, del segundo al sexto día existe una reducción acentuada en su tamaño, aumentando grandemente la población de los linfocitos pequeños casi carentes de citoplasma y, de núcleo muy teñido. Esta diferencia se hace aun más patente al noveno día en que pueden verse linfocitos más pequeños que los eritrocitos. Sin embargo, puede observarse en los días siguientes un nuevo aumento de tamaño con la aparición de células medianas y grandes, éstas últimas con la característica de presentar, en algunos casos, el núcleo dividido en dos fragmentos. Puede pensarse que estas células son linfocitos en estado de proliferación en las que núcleo y citoplasma han crecido asincrónicamente (Wintrobe, 1962). A partir de este punto (catorceavo día) puede observarse la disminución notoria en el número de los linfocitos pequeños (micro linfocitos) hasta finalizar el experimento. Debe notarse que la caída de los linfocitos pequeños corresponde al día en que se alcanza el equilibrio y por tanto sería menos necesaria la presencia de estas posibles células progenitoras.

Las modificaciones presentadas por los segmentados corresponden a variación en el tamaño y condensación de los gránulos del citoplasma. El cambio de tamaño de esta población se encuentra relacionado temporalmente con las modificaciones

presentadas por los linfocitos. Así, a partir del segundo día y hasta el sexto día además de la reducción de tamaño, existe una condensación de los gránulos típicos de estas células. Al noveno día, la diferencia entre la población de segmentados pequeños y grandes se hace aun más notoria ya que, los primeros muestran el núcleo apenas segmentado, y los segundos, un núcleo claramente dividido en cinco lóbulos separados entre sí (neutrófilos). Estas formas corresponden a segmentados ya "viejos" es decir, que han tenido el suficiente tiempo de maduración y de circulación antes de ser destruidos, al contrario de lo que sucede con las formas más pequeñas que han salido antes de completar su maduración. Al catorceavo día, parece establecerse el equilibrio entre ambas poblaciones de segmentados con la disminución en días posteriores de las formas pequeñas.

En cuanto a sus características morfológicas, los monocitos sufren al igual que las otras poblaciones una disminución en su tamaño. A partir del onceavo día pueden observarse algunas células con el núcleo dividido en dos o tres fragmentos, y al igual que para los linfocitos, puede considerarse que se trata de una célula inmadura que por el estímulo de la anemia ha salido a circulación. Es curioso notar que los monocitos "divididos" son de tamaño mayor que el resto de la población. Asimismo, a partir de este día, puede observarse un aumento en la basofilia del citoplasma evidente por la tinción más oscura del citoplasma y núcleo, aunado a la disminución de tamaño y al engrosamiento aparente de la cromatina. No todos los monocitos presentan estas características, sin embargo, dichos cambios modifican patentemente el aspecto de las células que-

dando en un estadio intermedio entre monocito y linfocito por lo que se les podría llamar monocitos "alinfadados" o linfocitos "amonados".

Los basófilos y los eosinófilos presentan modificaciones en cuanto a su tamaño únicamente, encontrándose células más pequeñas a partir del sexto día.

La sincronía en la aparición de formas pequeñas más abundantes a partir del sexto día corresponde al establecimiento de la fase de recuperación de la anemia, y puede interpretarse como el resultado de la médula ósea en su esfuerzo por aumentar la producción en tal forma que compense la pérdida por el sangrado diario.

Al establecerse el equilibrio en el número total de células blancas producidas, puede calcularse el número de células de cada tipo que se están produciendo. Así, tenemos que, segmentados y linfocitos corresponden a las poblaciones más abundantes y que en el conejo 2 se calcula un número producido de células por día de 508.615×10^5 segmentados y 423.9125×10^5 linfocitos. Para los monocitos este valor es de 424.75×10^4 ; para basófilos 214.168×10^4 y, para los eosinófilos el número de células producidas es de 143.453×10^4 .

CONCLUSIONES

Los trabajos realizados con conejos Nueva Zelanda a los que se les indujo la anemia por sangrado diario presentan resultados muy interesantes que proporcionan un eslabón más en la larga cadena de los estudios encaminados al conocimiento de los mecanismos formadores de sangre y a la diferenciación celular.

Como primer punto se encontró un paralelismo entre los cambios que se presentan en los eritrocitos y los presentados por los leucocitos. Existe una fase aguda de la anemia en la que el número de eritrocitos/mm³ decrece, seguida por la etapa de recuperación hasta alcanzarse el nuevo equilibrio. Dadas las características propias de ambos tipos de células se espera que exista una diferencia en cuanto al tiempo en el que se alcanza el equilibrio, así, mientras que los glóbulos rojos se estabilizan al octavo día, los glóbulos blancos lo logran hasta el catorceavo día.

A su vez, los cambios observados en el número total de células blancas se encuentran estrechamente relacionados con la variación de dos poblaciones de leucocitos: los linfocitos por una parte y, lo que se ha llamado población SME que corresponde a segmentados, monocitos y eosinófilos. En la primera etapa de la anemia los linfocitos son los que determinan el aumento en la población, mientras que, en la recuperación, ambas poblaciones, con la predominancia de SME son las responsables de los cambios numéricos en la totalidad de las células. Los basófilos parecen comportarse en forma errática y

desfasada respecto a las otras dos poblaciones (linfocitos y SME) lo que resulta desconcertante si se considera que tanto SME como basófilos se derivan de la serie Mieloide y por tanto, se esperaría que las variaciones presentadas siguieran un mismo patrón en ambas poblaciones.

Por otra parte, se detectó la aparición de una población muy especial de linfocitos pequeños, de núcleo muy condensado y casi carentes de citoplasma que se ha llamado "microlinfocito", que a partir del segundo día aumentan constantemente y, que basándose en las evidencias presentadas por Ford (1968), puede considerarse como una célula madre linfoide en su camino al sitio de formación de nuevas células sanguíneas. Es este tipo celular principalmente, el que plantea una serie de preguntas acerca de los fenómenos de diferenciación celular que eventualmente serán aclaradas a través de minuciosos estudios que nos den a conocer sus potencialidades.

Por lo que respecta a las células sanguíneas inmaduras que se identificaron en la sangre periférica de los conejos, en realidad puede decirse muy poco. Aunque algunas poblaciones se encuentran desde el inicio del experimento por lo que podría considerarse como una enfermedad en estadio subclínico que ocasiona dicha desviación a formas más inmaduras, es notable el aumento en número que presentan principalmente en la fase de recuperación. A pesar de que forman una parte muy pequeña de la población total, los normoblastos y las bandas son los tipos celulares que manifiestan un mayor incremento.

Asimismo, no se encontraron relaciones de tipo cíclico que muestren la existencia de periodicidad en la producción

de las células sanguíneas de conejo, a pesar de que los mecanismos de producción se vieron grandemente amplificados por el estímulo producido por el sangrado diario.

En cuanto a las variaciones morfológicas de los leucocitos, los principales cambios detectados corresponden al tamaño que disminuyó en todas las poblaciones de glóbulos blancos, cambio que se vió acentuado por la aparición de eritrocitos de mayor tamaño a partir del noveno día; variaciones en la granulación de los segmentados y, propiedades de tinción de los monocitos.

Así, el trabajo continuo aprovechando las ventajas planteadas por la amplificación del sistema productor de sangre, será capaz, si se enfoca y trabaja adecuadamente, de proporcionar nuevas evidencias en los caminos de la hematopoyesis y su regulación, y, en la diferenciación celular.

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos de la inducción de la anemia en conejos por remoción diaria de un volumen constante de sangre. Por efecto de la anemia, el número de células blancas/mm³ de sangre sufre primero un aumento dado principalmente por los linfocitos, seguido de una disminución que presenta su mínimo al quinto día. A partir de este punto se presenta la fase de recuperación con el aumento máximo en el número de células al sexto día. En esta etapa las poblaciones de segmentados, monocitos y eosinófilos (SME) son las que determinan en forma importante el aumento en la población de los leucocitos. Los basófilos se comportan en forma errática y desfasada respecto a las otras dos poblaciones.

Asimismo, es muy interesante la aparición de "microlinfocitos" a partir del segundo día ya que se les puede considerar como células madre linfoides en su camino a los sitios de establecimiento para la formación de nuevas colonias de células sanguíneas.

En cuanto a la variación morfológica de los leucocitos, la más notoria es la disminución de tamaño en todas las poblaciones, situación más evidente a partir del noveno día en el que pueden observarse eritrocitos de mayor tamaño. Otras modificaciones son los cambios en la granulación de los segmentados y, en las propiedades tintóreas de los monocitos.

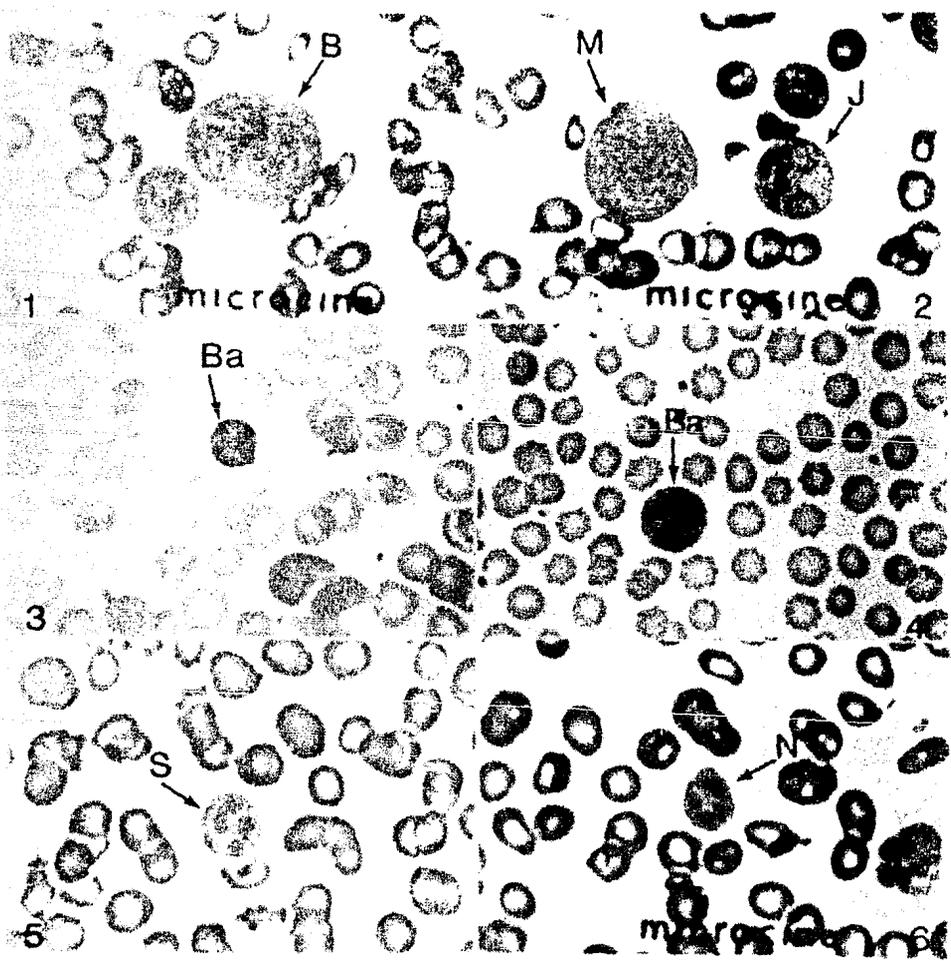


FIGURA 1.- Células de la Serie Mieloide. 1 y 2 corresponden a células inmaduras: Blasto (B), Mielocito (M) y Juvenil (J) (600 X). 3 y 4 Bandas (Ba) (400 X). 5 - Segmentado (S) y 6 Neutrófilo (N) (600 X)

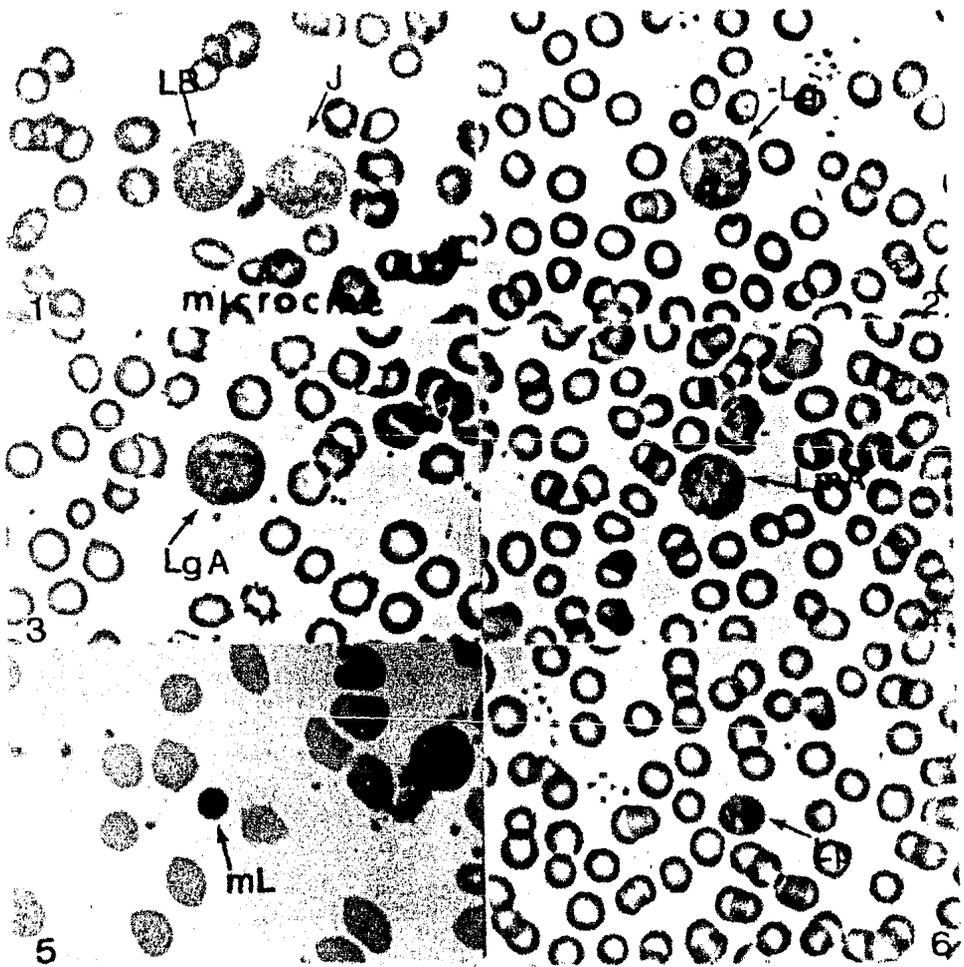


FIGURA 2.- Células Linfocíticas. 1 Linfoblas-
to (600 X) (LB) y Juvenil (J). 2 Linfocito --
Grande (Lg). 3 Linfocito grande modificado --
por la anemia (Lg A). 4 Linfocito mediano --
"amonado" (Lm A) (400 X). 5 Microlinfocito de
la anemia (mL) (600 X). 6 Linfocito pequeño -
(Lp) (400 X).

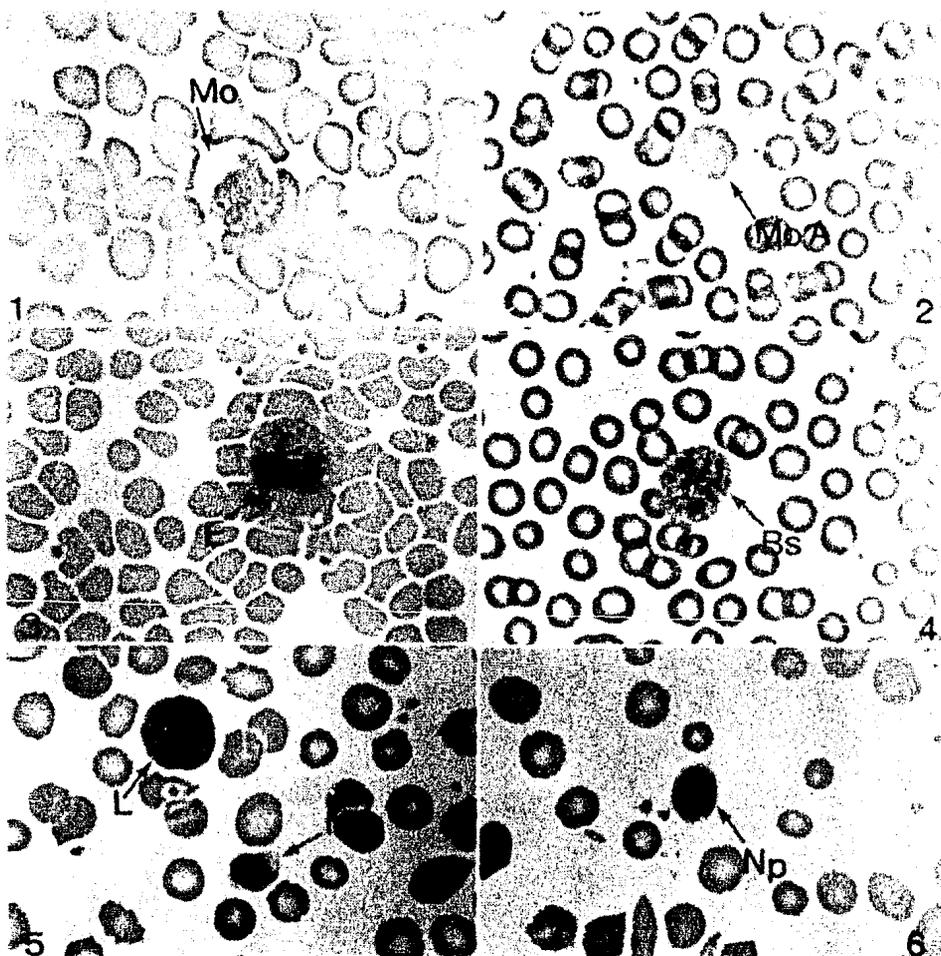


FIGURA 3.- 1 Monocito típico (Mo) (600 X).
 2 Monocito modificado "alinfado" (Mo A) --
 (400 X). 3 Eosinófilo (E) (600 X). 4 Basó-
 filo (Bs) (400 X). 5 Normoblasto tardío --
 (Nt) y Linfocito (L). 6 Normoblasto tempra
 no (Policromatófilo) (Np) (600 X).

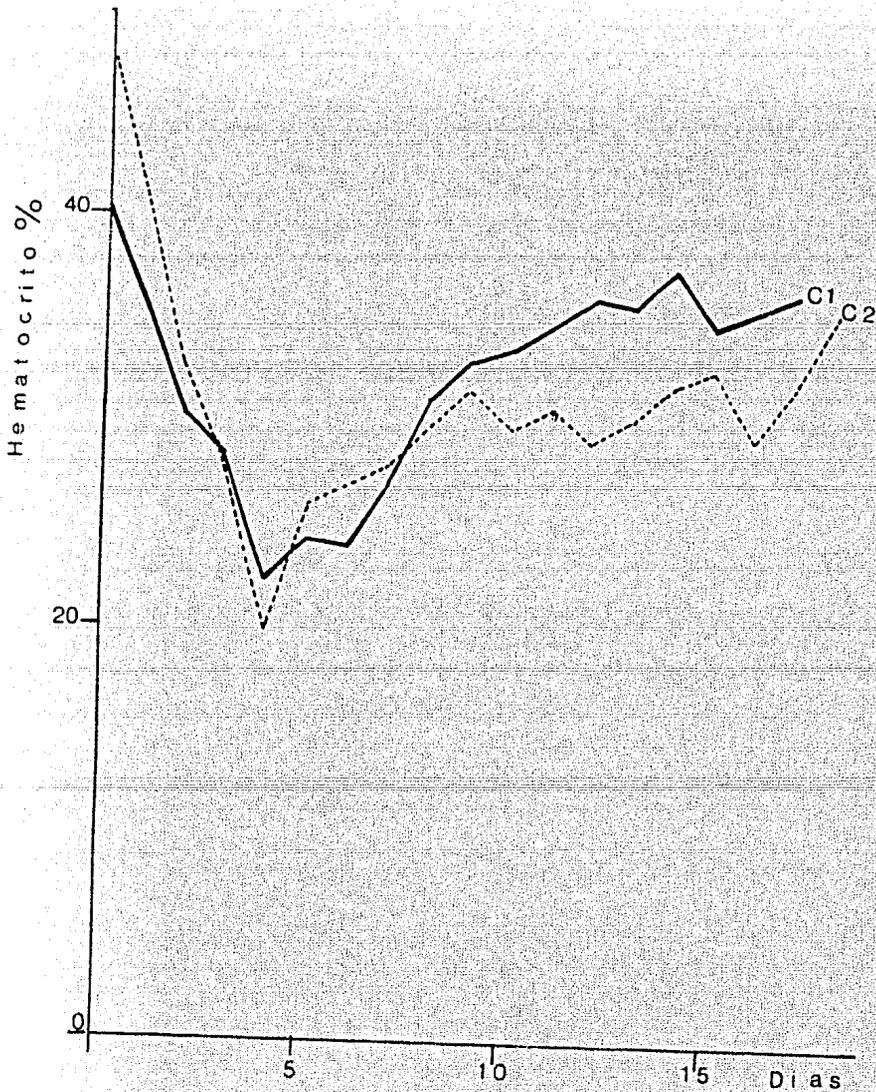


FIGURA 4.- Variación en el hematocrito de los Conejos 1 y 2 (C1 y C2) en respuesta al sangrado diario.

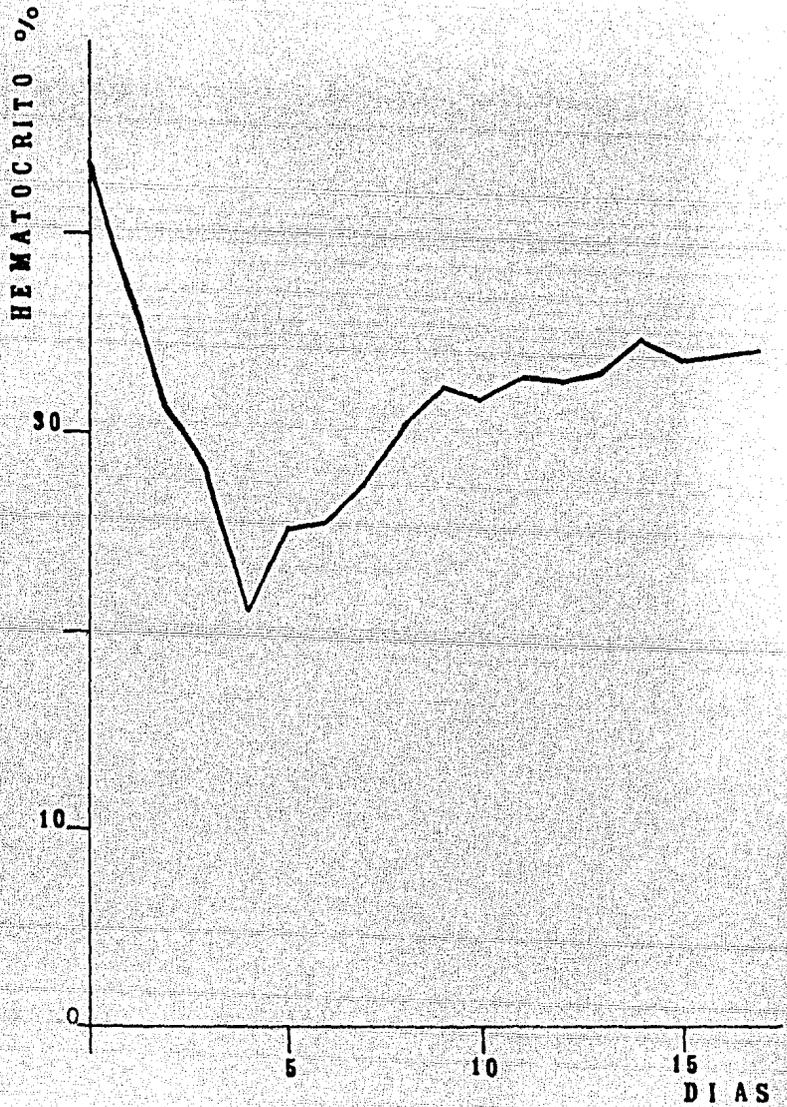


FIGURA 5.- Promedio de los valores obtenidos para el hematocrito de ambos conejos en respuesta a la inducción de la anemia.

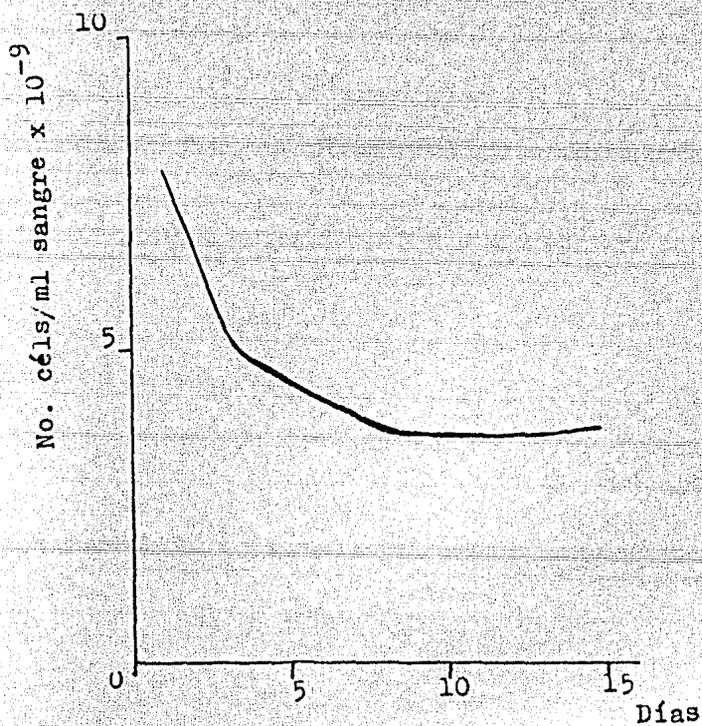


FIGURA 6.- Efecto de la remoción diaria de 30 ml de sangre sobre el número de células rojas por ml de la misma.

Tomada de Valdés López, V.M. (1977)

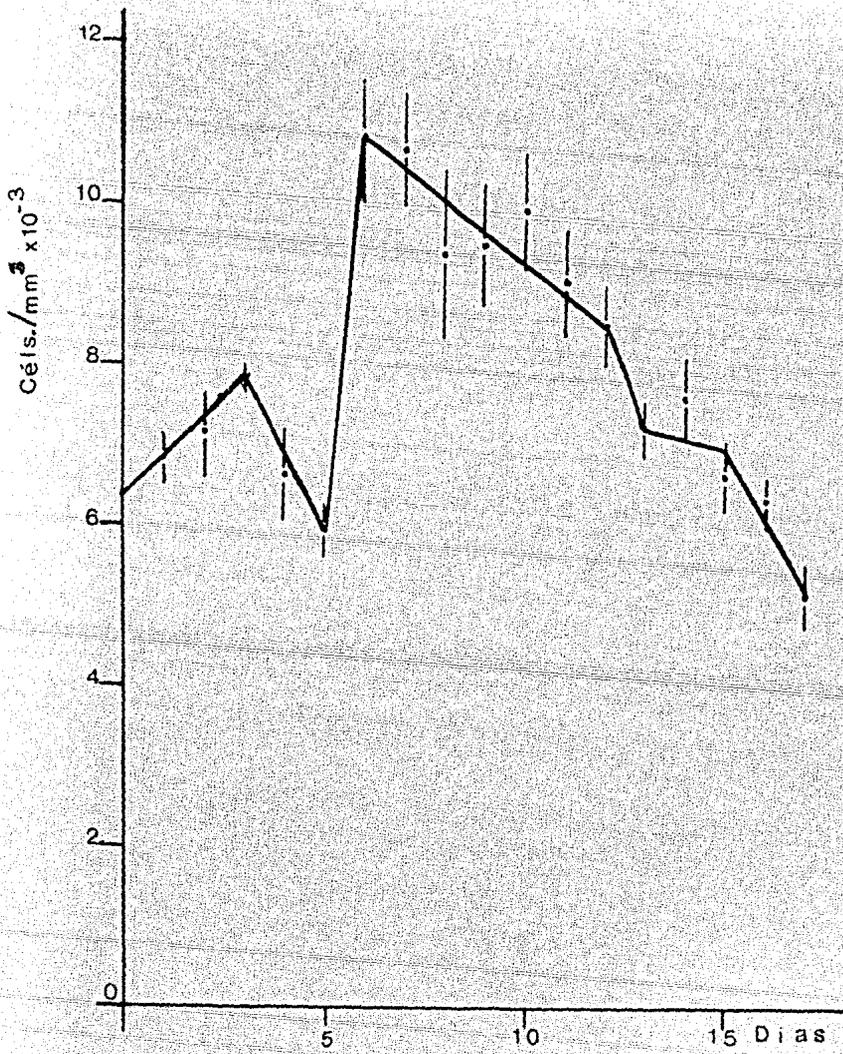


FIGURA 7.- Efecto de la remoción diaria de un volúmen constante de sangre (30 ml) sobre el número de células blancas por unidad de volúmen de la misma para el Conejo 1 (C1).

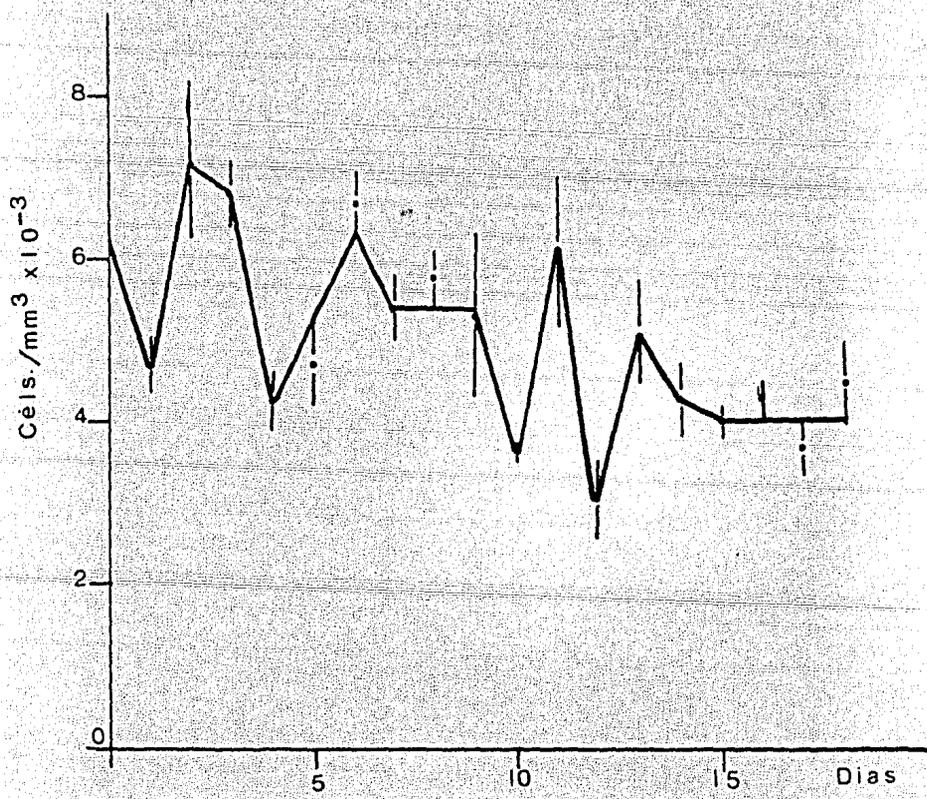


FIGURA 7'.- Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (25 ml) sobre el número de células blancas por unidad de volumen de la misma para el Conejo 2 (C2).

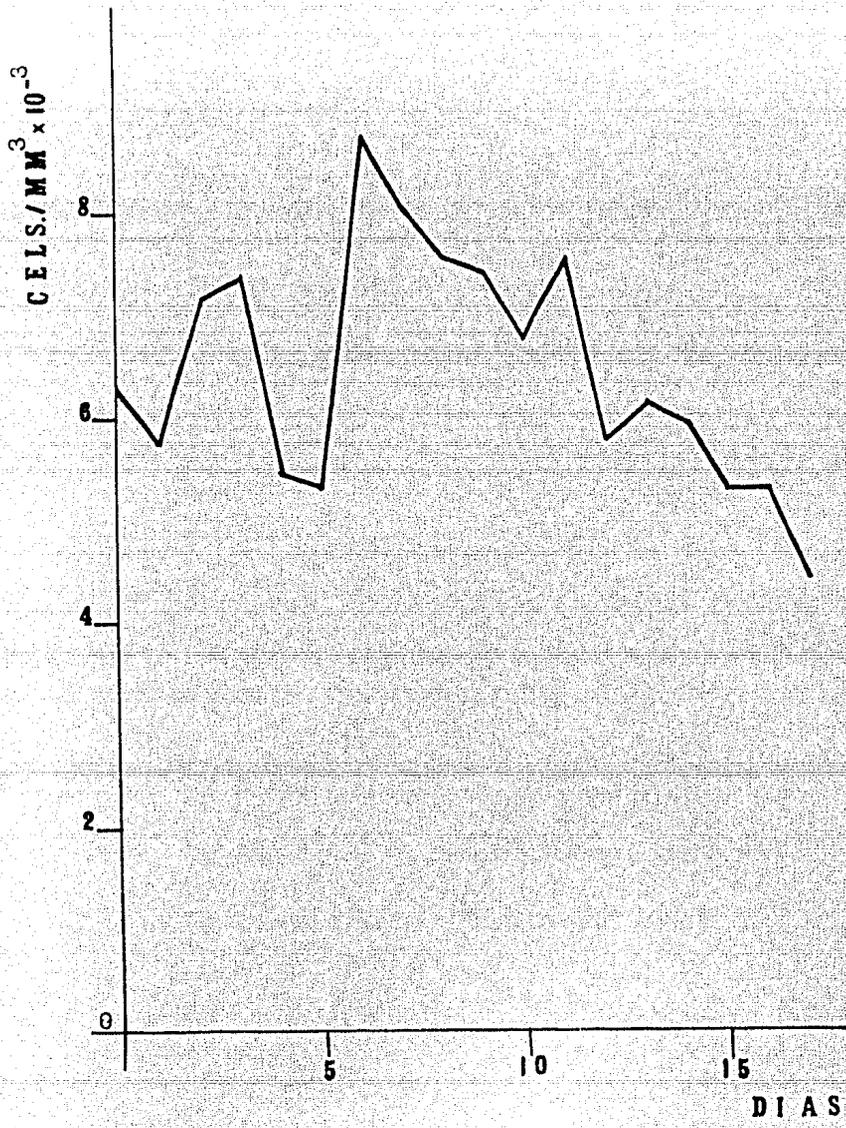


FIGURA 8.- Gráfica promedio de ambos conejos para la variación en el número de células blancas/mm³ de sangre respecto al día de sangrado.

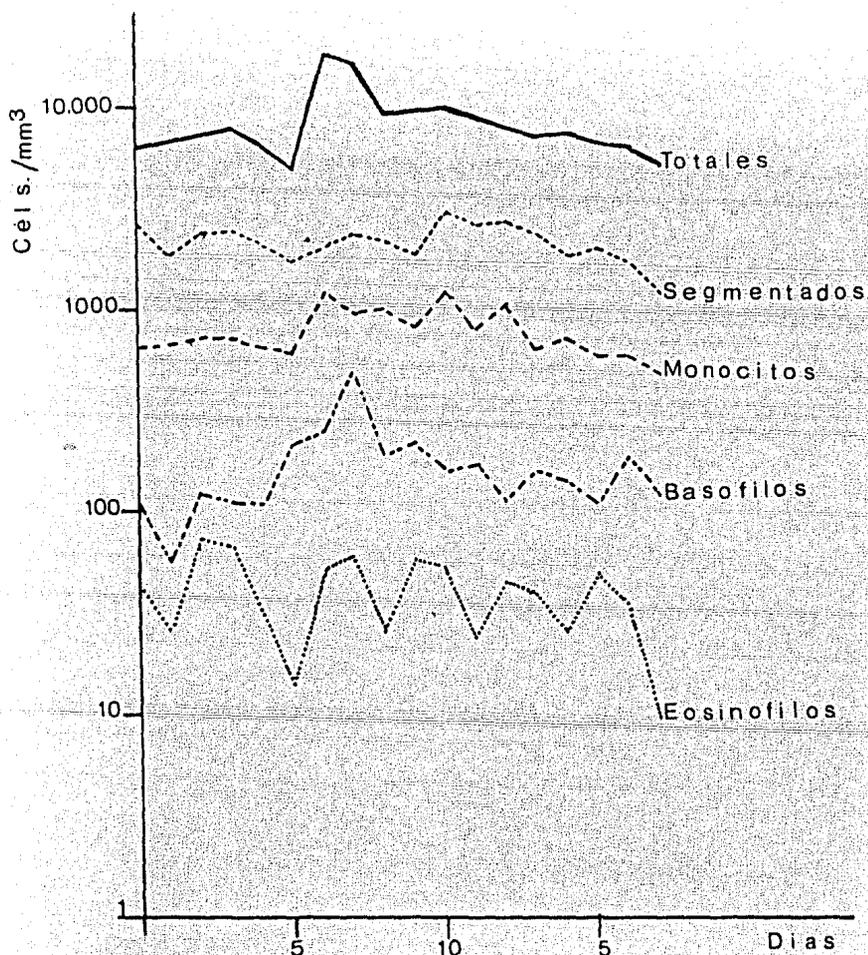


FIGURA 9.- Comparación del número total de células de las diferentes poblaciones de leucocitos respecto al día de sangrado para el Conejo 1 (C1).

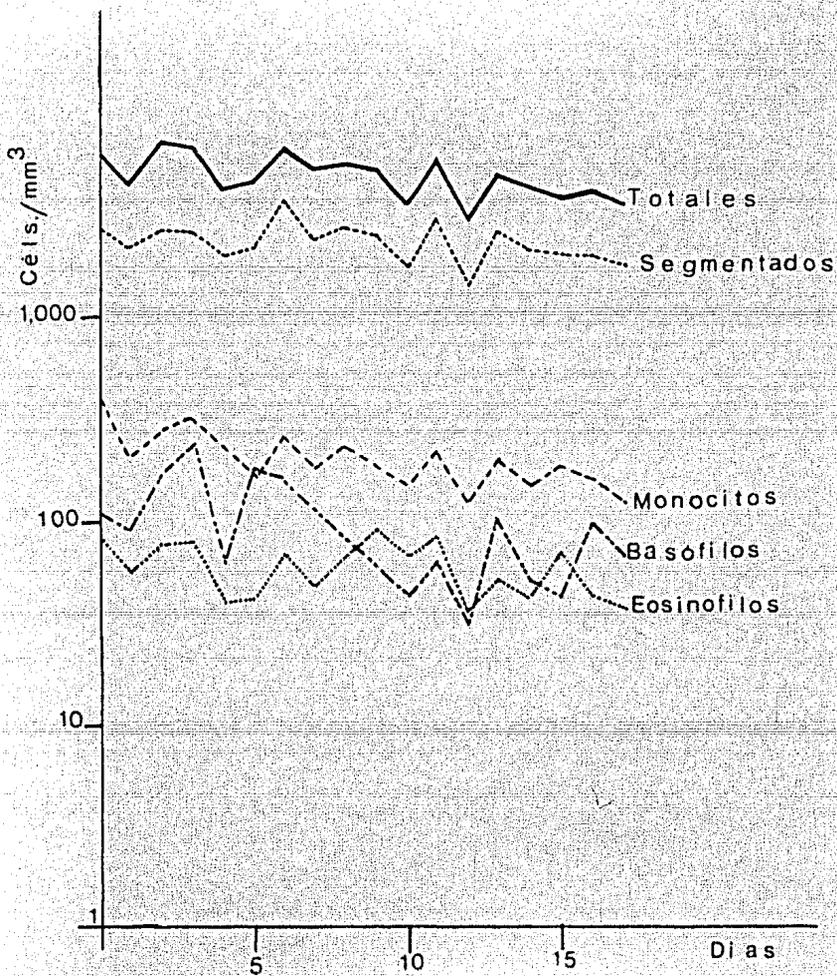


FIGURA 9'.-- Comparación del número total de células de las diferentes poblaciones de leucocitos respecto al día de sangrado para el Conejo 2 (C2).

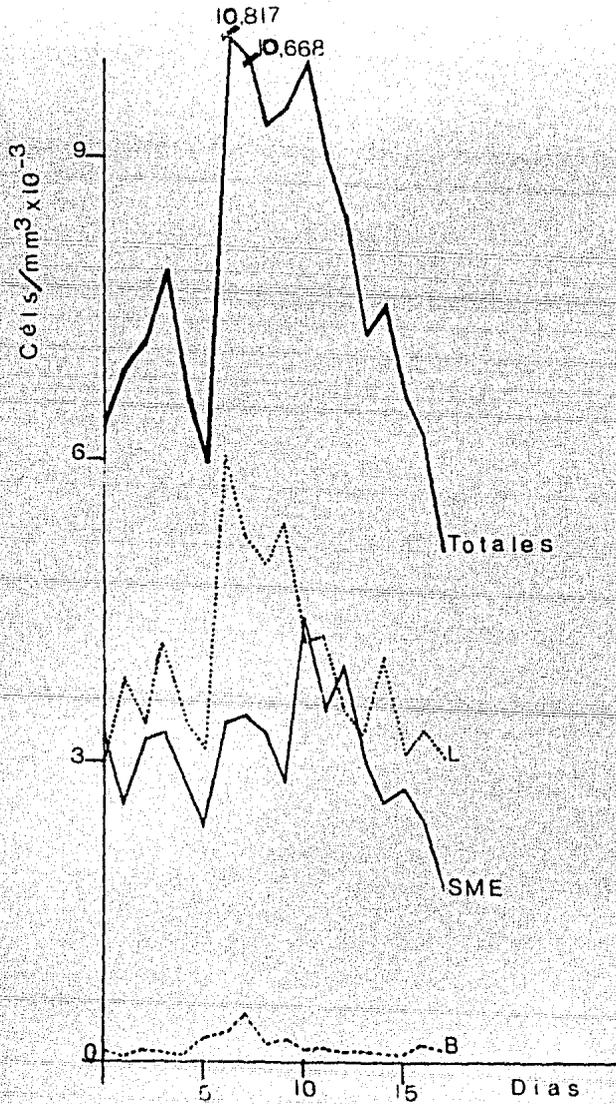


FIGURA 10.- Relación del número total de las poblaciones de segmentados, monocitos y eosinófilos (SME), Linfocitos (L) y Basófilos (B) con la variación en el número de leucocitos/mm³ de sangre respecto al día de sangrado para el Conejo 1 (C1).

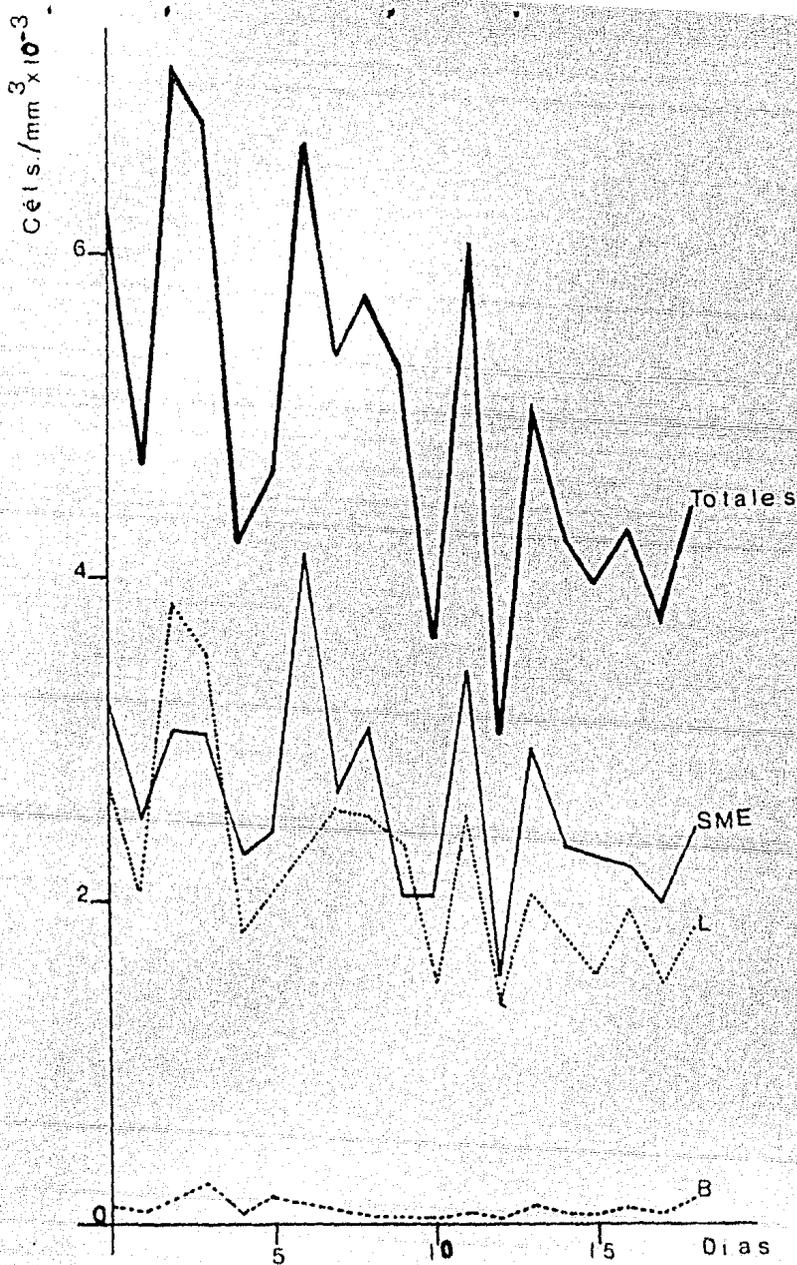


FIGURA 10'.- Relación del número total de las poblaciones de segmentados, monocitos y eosinófilos (SME), Linfocitos (L) y Basófilos (B) con la variación en el número de leucocitos/mm³ de sangre respecto al día de sangrado para el Conejo 2 (C2).

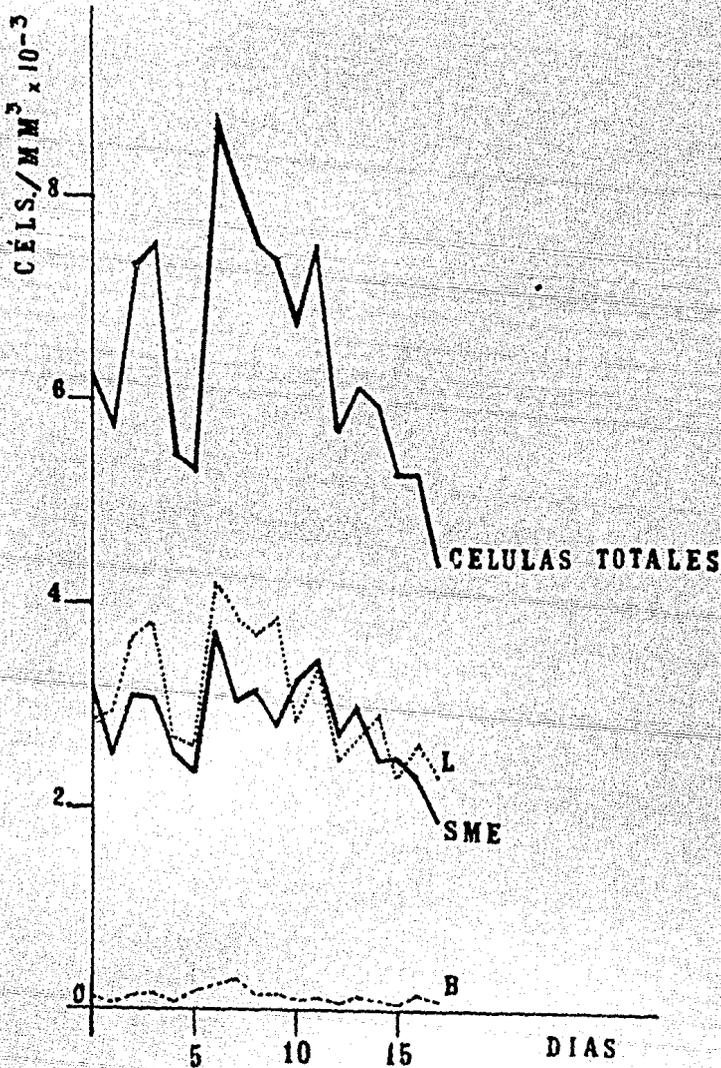


FIGURA 11.- Gráfica promedio de los dos conejos (C1 y C2) para la relación entre el número total de leucocitos por unidad de volúmen de la sangre y las poblaciones SME, linfocítica y basofílica, respecto al día de sangrado.

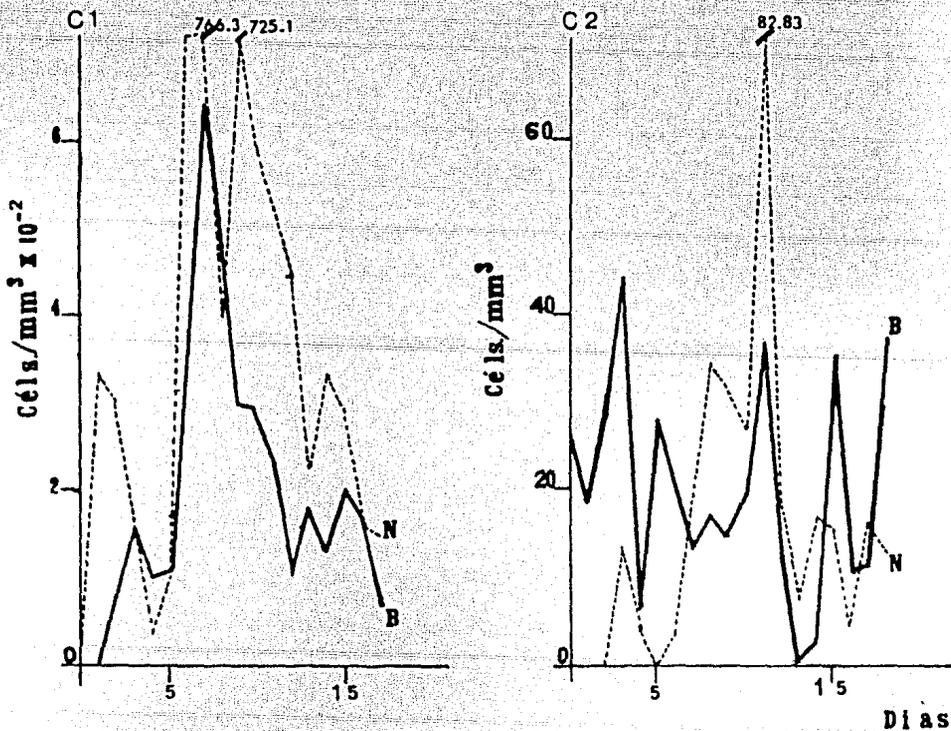


FIGURA 12.- Relación del número total de células inmaduras/mm³ de sangre más abundantes: Normoblastos (N) y Bandas (B) para los conejos 1 y 2 (C1 y C2) respecto al día de sangrado.

TABLA 1.- Variación del Hematocrito en respuesta a la inducción de la anemia.

DIA	CONEJO 1	CONEJO 2	PROMEDIO
	HEMATOCRITO %	HEMATOCRITO %	HEMATOCRITO %
0	40.10	47.686	43.893
1	34.90	39.408	37.154
2	30.29	32.504	31.397
3	28.64	27.884	28.262
4	22.38	19.704	21.042
5	24.39	26.128	25.259
6	24.03	27.184	25.607
7	27.31	27.850	27.580
8	31.22	29.960	30.590
9	33.09	31.730	32.410
10	33.74	29.805	31.772
11	34.95	30.900	32.925
12	36.27	29.205	32.737
13	35.90	30.325	33.112
14	37.68	32.030	34.855
15	34.92	32.850	33.885
16	-----	29.485	-----
17	36.54	32.170	34.355
18	-----	35.590	-----

TABLA 2.- Efecto de la remoción diaria de un volúmen constante de sangre sobre el número de leucocitos por mm^3 de la misma.

DIA	CONEJO 1 CELS/ MM^3	CONEJO 2 CELS/ MM^3	PROMEDIO CELS/ MM^3
0	6,368 \pm 486.39	6,195 \pm 255.79	6,281.50
1	6,350 \pm 262.66	4,670 \pm 325.26	5,760
2	7,150 \pm 527.61	7,150 \pm 890.95	7,150
3	7,865 \pm 129.09	6,820 \pm 411.82	7,342.50
4	6,641.6 \pm 547.28	4,240 \pm 349.85	5,440.80
5	5,942.5 \pm 317.02	4,695 \pm 480.55	5,318.75
6	10,817.5 \pm 769.21	6,675 \pm 410.36	8,746.25
7	10,668 \pm 710.44	5,380 \pm 405.13	8,024
8	9,371.6 \pm 1,033	5,755 \pm 317.49	7,563.33
9	9,506 \pm 733.33	5,300 \pm 1,060.3	7,403
10	9,933 \pm 716.37	3,620 \pm 41.63	6,776.50
11	9,018 \pm 641	6,070 \pm 913.19	7,544
12	8,495 \pm 499.46	3,030 \pm 452.10	5,762.50
13	7,212 \pm 336.77	5,080 \pm 620.10	6,146
14	7,582 \pm 507.58	4,250 \pm 439.76	5,916
15	6,626.6 \pm 432.1	3,965 \pm 160.41	5,295.80
16	6,318 \pm 290.76	4,275 \pm 210.07	5,296.50
17	5,135 \pm 390.44	3,680 \pm 320.20	4,407.50
18		4,465 \pm 487.81	

Las cifras que aparecen después de \pm representan la desviación estandar (S).

FALLA DE

ORIGEN.

SERVICIOS DE

MICROFILMACION.

TABLA 3

Variación del porcentaje de cada una de las poblaciones de leucocitos a lo largo de los días de sangrado para el Conejo 1 (C1). La primera cifra de cada columna representa el porcentaje de las células (%) y, la segunda el porcentaje de error (%E).

DIA	Basófilos		Eosinófilos		Segmentados		Monocitos		Linfocitos		Mielocitos		Juveniles		Bandas		Pronormoblastos		Blastos		Sin Identificar	
	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E
0	1.79	5.55	0.69	14.2	40.8	1.21	10.3	1.92	45.9	0.86	0.99	100					0.29	100				
1	0.85	11.7	0.38	0	27.3	3.12	9.88	5.76	56.1	1.18	0.38	0					4.94	15.3				
2	1.75	11.7	1.07	9.09	33.5	3.49	10.1	2.88	47.7	2.86	0.19	0			1.17	8.3	4.21	32.5				
3	1.46	26.5	0.88	22.2	30.8	1.26	9.30	1.05	52.9	0	0.48	20			2.05	4.7	1.86	10.5	0.097	100		
4	1.68	17.5	0.49	20	32.2	2.46	10.0	0.99	53.5	3.15					1.49	60	0.49	100				
5	3.65	26.5	0.24	0	28.7	10.5	10.7	13.6	52.9	14.0					1.82	46.6	1.34	45.4	0.487	0		
6	2.36	21.0	0.49	50	19.4	21.7	11.4	9.78	56.3	11.6	0.62	20			2.61	4.76	6.59	16.9	0.124	0		
7	4.75	4.87	0.57	60	22.2	1.04	9.26	8.75	48.8	9.47	1.04	11.1			6.02	5.76	7.18	11.2				
8	2.07	13.8	0.28	33.3	23.7	3.22	10.9	0	52.4	3.28	1.05	18.1	0.287	33.3	4.88	15.6	4.12	6.81				
9	2.36	19.2	0.64	42.8	19.8	5.01	8.82	3.12	56.8	1.13	0.183	0	0.091	100	3.12	5.88	7.62	10.8			0.459	40
10	1.65	16.5	0.55	0	31.3	1.17	12.7	3.03	42.3	0.21	0.276	33.3	0.092	100	2.94	9.37	6.07	3.03	0.092	100	1.749	10.5
11	1.43	3.33	0.27	33.3	29.6	5.25	8.99	3.05	46.7	3.13	0.825	11.1	0.733	50	2.56	10.7	5.87	12.5	0.366	25	2.018	4.94
12	2.32	4.7	0.55	33.3	32.8	5.38	12.8	3.04	41.8	9.35	1.491	18.7	0.093	100	1.21	7.69	5.31	5.26	0.186	0	1.211	33.1
13	2.37	12.5	0.56	16.6	33.7	3.38	9.02	4.21	45.4	0.83	1.234	7.69	0.189	0	2.46	30.7	3.13	16.1	0.094	100	1.804	36.3
14	1.16	5.38	0.34	33.3	24.3	17.6	9.61	6.02	53.7	2.58	0.347	33.3	0.695	50	1.73	13.3	4.40	7.89			2.78	4.16
15	1.13	16.6	0.74	12.5	31.5	2.67	9.08	2.06	46.3	1.41	0.842	11.1	0.28	33.3	3.18	5.88	4.4	5.51			1.87	16
16	3.10	15.7	0.53	16.6	28.0	13.1	9.52	3.06	52.6	6.45	0.485	20	0.097	100	2.62	18.5	2.52	15.3			2.29	33.2
17	2.42	12	0.19	100	23.7	3.53	9.68	1	59.2	3.43	0.387	50	0.193	0	1.25	7.69	2.90	13.3				

TABLA 3'

Variación del porcentaje de cada una de las poblaciones de leucocitos a lo largo de los días de sangrado para el Conejo 2 (C2). La primera cifra de cada columna representa el porcentaje de células (%) y, la segunda el porcentaje de error (%E).

DIA	Basófilos		Eosinófilos		Segmentados		Monocitos		Linfocitos		Mielocitos		Juvéniles		Bandas		Normoblastos		Blastos	
	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E	%	%E
0	1.80	22.2	1.40	0	44.30	2.46	7.0	7.14	44.90	1.78	0.05	100	0.10	100	0.45	15				
1	2.0	5.0	1.25	12	47.2	0.41	4.55	20.8	44.0	2.45					0.4	0				
2	2.4	12.5	1.1	9.09	37.75	7.01	3.95	3.79	54.35	1.38	0.05	100			0.4	75				
3	3.5	2.85	1.2	16.6	38.25	0.91	4.75	5.28	51.4	2.14	0.05	100			0.65	53.8	0.20	50		
4	1.55	3.22	0.95	5.26	47.45	0.31	5.45	17.4	44.35	2.14					0.15	100	0.10	0		
5	3.85	9.09	0.9	0	46.9	1.49	3.65	1.36	44.05	1.92	0.05	100			0.6	33.3				
6	2.4	0	1.05	4.76	56.95	0.96	4.0	30	35.2	1.98			0.05	100	0.3	0	0.05	100		
7	2.05	17.7	0.9	11.1	45.25	2.76	3.45	7.24	47.70	1.67	0.05	100			0.25	20	0.35	14.2		
8	1.45	10.3	1.15	13.0	48.45	0.92	4.15	3.61	43.7	0.22	0.05	100	0.1	0	0.3	33.3	0.6	0	0.05	100
9	1.2	16.6	1.75	20	48.0	0.41	3.6	5.55	44.1	0.68	0.2	100	0.2	100	0.3	33.3	0.6	16.6	0.05	100
10	1.2	16.6	1.9	36.8	49.45	1.51	4.2	4.76	41.2	3.15	0.2	0	0.5	60	0.55	9.09	0.75	6.66	0.05	100
11	1.05	14.2	1.4	7.14	50.35	1.68	3.7	2.70	41.2	3.64	0.2	50	0.15	33.3	0.6	50	1.35	3.70		
12	1.04	14.2	1.2	8.33	46.75	0.96	4.15	3.61	45.25	0.33	0.15	33.3	0.3	0	0.4	0	0.6	0	0.15	33.3
13	2.1	0	1.05	4.76	52.5	3.04	4.05	8.64	39.7	3.02	0.2	0	0.2	0			0.15	33.3	0.05	100
14	1.25	4	1.0	0	50.7	0.33	3.65	12.3	42.7	2.10	0.05	100	0.2	50	0.05	100	0.4	25		
15	1.1	9.09	1.2	0	50.25	1.07	4.75	1.05	32.65	2.32	0.25	20	0.2	50	0.9	11.1	0.4	0		
16	2.3	8.69	1.05	4.76	47.65	0.10	3.8	5.26	44.45	1.01	0.1	0	0.25	20	0.25	20	0.1	0	0.05	100
17	1.9	26.3	1.05	4.76	49.45	0.50	3.5	0	42.9	0.23	0.35	14.2	0.1	0	0.3	0	0.45	11.1		
18	3.65	1.36	2.0	0	47.7	0.83	4.75	5.26	40.4	0.24	0.35	14.2			0.85	5.88	0.3	0		

TABLA 4

Variación en el número de células por mm^3 de sangre de cada uno de los tipos de leucocitos a lo largo del periodo de sangrado para el Conejo 1 (C1).

DIA	Basófilos	Eosinófilos	Segmentados	Monocitos	Linfocitos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Pronormoblastos	Blastos	Sin Identificar
0	114.114	44.3976	2600.054	659.088	2923.548	6.3425			19.0275		
1	58.225	26.03	1874.845	676.78	3847.645	26.03			338.39		
2	125.983	77.055	2401.971	728.299	3417.414	13.9425		84.0125	301.0865		
3	115.53	69.29	2425.509	731.759	4167.427	38.459		161.704	146.289	7.629	
4	112.176	33.008	2138.993	666.750	3558.436			92.036	33.008		
5	217.376	14.493	1710.251	637.689	3145.127			108.688	79.688	28.939	
6	255.617	53.817	2098.811	1237.738	6094.904	67.263		282.444	713.089	13.446	
7	506.73	61.767	2373.309	988.816	5216.545	111.160		642.747	766.389		
8	197.460	26.896	2226.144	1023.291	4919.184	98.683	26.896	457.805	386.487		
9	227.098	61.123	1887.131	838.714	5399.503	17.395	8.65	297.0625	725.117		43.6325
10	164.589	54.830	3118.862	1271.324	4207.320	27.413	9.138	392.626	603.6284	9.138	173.728
11	173.686	24.7995	2672.303	810.718	4219.341	74.3985	66.1019	231.582	529.4467	33.005	181.983
12	117.848	47.487	2974.685	1092.541	3554.732	126.660	7.908	102.874	451.254	15.200	102.874
13	164.361	41.036	2431.381	650.594	3280.666	38.996	13.630	178.064	225.951	6.6444	130.104
14	149.289	26.309	1844.928	729.160	4076.462	26.309	52.594	131.755	333.835		210.779
15	111.658	49.633	2090.957	601.827	3071.296	55.795	18.554	210.924	291.570		124.040
16	195.426	36.833	1774.410	601.663	3317.816	30.648	6.128	165.721	159.592		18.385
17	124.267	9.910	1217.508	497.058	3041.974	19.872	9.910	64.187	148.915		

TABLA 4'

Variación en el número de células por mm³ de sangre de cada uno de los tipos de leucocitos a lo largo del periodo de sangrado para el conejo 2 (C2).

DIA	Basófilos	Eosinófilos	Segmentados	Monocitos	Linfocitos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Normoblas- tos	Elastos
0	111.51	86.73	2744.385	433.65	2781.555	3.0975	6.195	27.8775		
1	93.40	58.375	2232.26	212.485	2054.80			18.68		
2	171.60	78.65	2699.125	282.425	3225.025	3.575		28.60		
3	238.7	81.84	2608.65	323.95	3505.48	3.575		44.33	13.64	
4	65.72	40.28	2011.88	231.08	1880.44			6.36	4.24	
5	180.7575	42.255	2201.955	171.3675	2068.1475	2.3475		28.17		
6	160.20	70.087	3801.4125	267.00	2349.6		3.3375	20.025	3.3375	
7	110.29	48.42	2434.45	185.61	2566.26	2.69		13.45	18.83	
8	83.4475	66.182	2788.2975	238.832	2514.935	2.8775	5.755	17.265	34.53	2.8775
9	63.60	92.75	2544.0	190.80	2737.30	10.60	10.60	15.90	31.80	2.65
10	43.44	68.78	1790.09	152.04	1491.44	7.24	18.10	19.91	27.15	1.81
11	64.428	85.904	3089.476	227.032	2528.032	12.272	9.204	38.816	82.836	
12	31.8675	36.42	1418.8625	125.9525	1363.3375	4.5525	9.105	12.14	18.21	4.5525
13	106.68	53.34	2667.0	205.74	2016.76	10.16	10.16		7.62	2.54
14	53.125	42.5	2154.75	155.125	1814.75	2.125	8.5	2.125	17.0	
15	43.615	71.37	2020.1675	188.3375	1572.1225	9.3125	7.93	35.685	15.86	
16	98.325	44.8875	2037.0375	162.45	1900.2375	4.275	10.6875	10.6875	4.275	2.1375
17	70.3	38.85	1829.75	129.5	1587.3	12.95	3.7	11.1	16.65	
18	162.9725	89.3	2129.805	212.0875	1803.86	15.6275		37.9525	13.395	

TABLA 5.- Comparación del número de células por mm^3 de sangre de las poblaciones SME, Basófilos y Linfocitos para ambos conejos (C1 y C2) a lo largo del periodo de sangrado.

DIA	SME (Céls/ mm^3)	BASOFILOS (Céls/ mm^3)	LINFOCITOS (Céls/ mm^3)
0	3,284.1525	112.8122	2,852.5515
1	2,540.3875	75.8125	2,951.2225
2	3,133.7625	148.7915	3,651.7195
3	3,120.9997	177.1184	3,836.4537
4	2,560.9955	88.9480	2,719.4380
5	2.389.0055	199.0667	2,606.6375
6	3,764.4330	207.9087	4,222.2520
7	3,046.1860	308.5100	3,891.4025
8	3,184.8220	140.4537	3,717.0596
9	2,807.2592	145.3490	3,868.4015
10	3,227.9636	104.0149	2,848.8804
11	3,455.1168	119.0570	3,373.6869
12	2,757.9740	74.8577	2,464.0347
13	3,024.5455	135.5205	2,648.7130
14	2,476.3860	101.2070	2945.6060
15	2,511.1460	77.6365	2,321.7092
16	2,328.6405	146.8755	2,614.0267
17	1,861.2430	97.2835	2,314.6370

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adamson, J.W.; D.C. Dale and R.J. Elin. Hematopoiesis in the Grey Collie Dog. *The Journal of Clinical Investigation* 54:965-973 (1974).
- 2.- Alba-Lois, L.; Valdés López, V.M.; Becerril Luján, B.; Mainero del Paso, A. y Martínez Medellín, J. Estudios sobre el Proceso de Formación de Reticulocitos en Conejos Anémicos. XI Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mazatlán, Sinaloa. pp.22 (1976).
- 3.- Becerril, B.; Mainero, A.; Valdés, V.M.; Alba Lois, L. y Martínez Medellín, J. Identificación y Cuantificación de las Células Sanguíneas en Conejos Anémicos. XI Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mazatlán, Sinaloa. pp.23 (1976).
- 4.- Bernal, J.D. SCIENCE IN HISTORY. Penguin Books. England, Volumes 1, 2 and 3. (1969).
- 5.- Casey, A.E.; P.D. Rosahn; C. Hu and L. Pearce. The Hemocytological Constitution of Adult Male Rabbits from Fifteen Standard Breeds. *J. Exper. Med.* 64:453-469 (1936).
- 6.- Casey, A.E. The Diurnal Levels of Blood Leukocytes in the Normal Rabbit. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 45: 363-366 (1940).
- 7.- Cheng, S.C. Leucocyte Count in Rabbit: Observations on the Influence of Various Physiological Factors and Pathological Conditions. *Am. J. Hyg.* 11:449-533 (1930).
- 8.- Ford, C.E.; H.S. Micklem and D.A. Ogden. Evidence for the Existence of a Lymphoid Stem Cell. *The Lancet* 1:621-622 (1968).
- 9.- Ham, A. TRATADO DE HISTOLOGIA. Interamericana, México. Ed. (1970).

- 10.- Iscove, N.N.; J.E.Till and E.A.McCulloch. The Proliferative States of Mouse Granulopoietic Progenitor Cells. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134(1):33-36. (1970)
- 11.- Lawrence, J.G. Physiology and Functions of the White Blood Cells. The Minot Lecture. J.A.M.A. 157(14):1212-18 (1955).
- 12.- McCulloch, E.A. and J.E.Till. The Sensitivity of Cells from Normal Mouse Bone Marrow to Gamma Radiation in Vitro and in vivo. Radiation Research 16:822-832 (1962).
- 13.- McCulloch, E.A.; L.Siminovitch and J.E.Till. Spleen-Colony Formation in Anemic Mice of Genotype WWv. Science 144 (1620):844-846 (1964).
- 14.- McCulloch, E.A. Differentiation of Hematopoietic Stem Cells. in: Regulation of Hematopoiesis. Vol. I. A.S. Gordon (Ed). Appleton-Century-Crofts. New York. Ch.VII:260-271 (1970).
- 15.- McCulloch, E.A. and J.E.Till. Regulatory Mechanisms Acting on Hemopoietic Stem Cells. AM.J.Pathol.65:601-19 (1971).
- 16.- McCulloch, E.A.; C.J.Gregory and J.E.Till. Cellular Communication Early in Haemopoietic Differentiation. Hemopoietic Stem Cells Ciba Foundation Symposium 13 Published by ASP. Amsterdam (1973).
- 17.- McCulloch, E.A.; T.W.Mak; G.B.Price and J.E.Till. Organization and Communication in Populations of Normal and Leukemic Hemopoietic Cells. Biochimica et Biophysica Acta 355: 260-299 (1974).
- 18.- Metcalf, M.A. and S.Moore. HEMOPOIETIC CELLS. North Holland Publishing Co. Frontiers of Biology. Netherlands (1971).
- 19.- Messner, H.A.; J.E.Till and E.A.McCulloch. Interacting Cells Populations Affecting Granulopoietic Colony Formation by Normal and Leukemic Human Marrow Cells. Blood 42: 701-710 (1973).
- 20.- Nelsen, E.O. COMPARATIVE EMBRIOLOGY OF THE VERTEBRATES McGraw-Hill Book Co. USA (1953).

21.- Patt, D.M.; J.E.Lund and M.A.Maloney. Cyclic Hematopoiesis in Grey Collie Dogs: A Stem Cell Problem. *Blood* 42 (6) 873-884 (1973).

22.- Pintor, P.P. and V.Grassini. Individual and Seasonal Spontaneous Variations of Hematological Values in Normal Male Rabbits. *Acta Hemat.* 17:122 (1957).

23.- Price, G.B.; E.A.McCulloch and J.E.Till. A New Human Low Molecular Weight Granulocyte Colony Stimulating Activity. *Blood* 42:341-348 (1973).

24.- Price, G.B.; J.S.Senn; E.A.McCulloch and J.E.Till. Heterogeneity of Molecules with Low Molecular Weight Isolated from Media Conditioned by Human Leukocytes and Capable of Stimulating Colony Formation by Human Granulopoietic Progenitor Cells. *Journal of Cellular Physiology* 84 (3):383-395 (1974).

25.- Rosahn, P.D.; L.Pearce and C.Hu. Comparison of the Hemocytological Constitution of Male and Female Rabbits. *J.Exper.Med.* 60:687-699 (1934).

26.- Rubin, S.H. and D.H.Cowan. Assay of Granulocytic Progenitor Cells in Human Peripheral Blood. *Exp. Hemat.* 1: 127-131 (1973).

27.- Sandoz. *ATLAS OF HEMATOLOGY*. (1952).

28.- Sarton, G. *CIENCIA ANTIGUA Y CIVILIZACION MODERNA*. Breviarios del Fondo de Cultura Económica, No. 155. México, (1960).

29.- Siminovitch, L.; E.A.McCulloch and J.E.Till. The Distribution of Colony-forming Cells Among Spleen Colonies. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 62(3):327-336 (1963).

30.- Takaku, F. and Y. Miura. *ERYTHROPOIETIN* In: Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes. Edited by H.Yoshikawa and S.M. Rapoport. University Park Press. Japan (1974).

31.- Till, J.E.; E.A.McCulloch and L.Siminovitch. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. Proc.N.A.S. 51(1):29-36 (1964).

32.- Till, J.E.; L.Siminovitch and E.A.McCulloch. The Effect of Plethora on Growth and Differentiation of Normal Hemopoietic Colony Forming Cells Transplanted in Mice of Genotype W/W^V. Blood 29 (1): 102-113 (1967).

33.- Till, J.E.; H.A. Messner; G.B. Price, M.T.Aye and E.A.McCulloch. Factors Affecting Normal and Leukemic Hemopoietic Cells in Culture. In:Control of Proliferation in Animal Cells. Cold Spring Harbour Laboratory. pp.907-913 (1974).

34.- Valdés López, V.M. Estudios sobre la Dinámica de Formación de la Sangre en Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis de Licenciatura UNAM México (1977).

35.- Williams, J.W.; E.Beutler; A.J.Erslen and R.Wayne Rundles. HEMATOLOGY. McGraw-Hill Book Co. USA (1972).

36.- Wintrobe, M.M. CLINICAL HEMATOLOGY. Lea and Febiger Philadelphia. 5th Edition (1962).

37.- Worton, R.G.; E.A.McCulloch and J.E.Till. Physical Separation of Hemopoietic Stem Cells from Cells Forming Colonies in Culture. J.Cell.Physiol. 74(1):171-182 (1969).

38.- Yoshikawa, H. Introduction. In: Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes. Edited by H.Yoshikawa and S.M. Rapoport. University Park Press, Japan.(1974).